

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Vinícius Lopes Cantuária

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE

***Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (ASTERACEAE)**

Diamantina-MG

2018

Vinícius Lopes Cantuária

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE

***Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helen Rodrigues Martins

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernanda Fuzer Grael

DIAMANTINA-MG

2018

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C233e

Cantuária, Vinícius Lopes

Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (Asteraceae) / Vinícius Lopes
Cantuária, 2019.
199 p. : il.

Orientadora: Helen Rodrigues Martins

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Plantas medicinais. 2. Perfil fitoquímico. 3. Atividade antibacteriana. 4. Atividade antifúngica. I. Martins, Helen Rodrigues. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.321

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa, CRB6 – 3468.

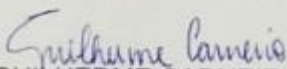
VINÍCIUS LOPES CANTUÁRIA

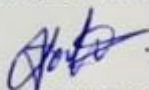
**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE
Eremanthus erythropappus (DC) MacLeish (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, nível de
MESTRADO como parte dos requisitos
para obtenção do título de MESTRE
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Helen
Rodrigues Martins

Data da aprovação : 18/12/2018


Prof.Dr. GUILHERME CARNEIRO - UFVJM


Prof.Dr.^a HELEN RODRIGUES MARTINS - UFVJM


Prof.Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY - UFVJM

DIAMANTINA

Dedico este trabalho aos meus pais Edson e Neide, por todo carinho, amor, compreensão, pelo apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ser a minha fortaleza e meu refúgio, pois me permitiu chegar até aqui, me concedendo forças pra lutar e superar as dificuldades que foram encontradas. Agradeço aos meus pais Edson e Neide por todo carinho transmitido, por estar sempre ao meu lado ao longo desta trajetória, independente dos obstáculos encontrados. As minhas irmãs Núbia e Andressa, pelo companheirismo e apoio, vocês são muito especiais pra mim. A minha namorada Bruna Thailise, por todo incentivo, amor, paciência, companheirismo e por estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Helen Rodrigues Martins, pela disponibilidade em me orientar, pela paciência e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desse tempo, pela ajuda na realização deste projeto e por ter contribuído no meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernanda Fuzer Grael, pela co-orientação, por todo apoio, ajuda e por ter contribuído no meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os amigos dos laboratórios de Doenças Parasitárias (Farmácia) e do LADIP (CIPq-Saúde).

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, aos fomentos à pesquisa CNPq e FAPEMIG e, ao departamento de Farmácia e a todos os meus professores.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e torceram para esta conquista. Muito obrigado!

RESUMO

A espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish., (Asteraceae) é conhecida popularmente como Candeia e, ocorre naturalmente na região de Cerrado, inclusive no município de Diamantina, região do Vale do Jequitinhonha e Mucuri. Na medicina popular tem sido utilizada no tratamento de úlceras estomacais, como anti-inflamatória, cicatrizante e contra infecções bacterianas e fúngicas. Apesar de sua rica biodiversidade, muitas espécies endêmicas deste bioma ainda são pouco estudadas do ponto de vista químico e biológico. Diante disso, é necessário maiores investimentos em pesquisas com plantas medicinais, principalmente, quando se trata de doenças cujo arsenal terapêutico é limitado e/ou tratamento apresenta limitações de eficácia e efeitos colaterais, como é o caso da Doença de Chagas, Leishmanioses, Câncer e as infecções bacterianas e fúngicas. Estudos preliminares com cerca de 32 plantas desta região já foram realizados anteriormente pelo nosso grupo e, dentre elas a espécie *E. erythropappus* se mostrou promissora por apresentar importantes atividades biológicas, sendo selecionada neste estudo para dar prosseguimento nos seus estudos químicos e biológicos. Desta forma, o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *E. erythropappus* foi utilizado inicialmente para obtenção das frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica, dos quais resultaram na identificação de oito metabólitos secundários, pertencentes às classes dos ácidos e ésteres de ácidos graxos, terpenóide, composto fenólico e flavonóides. Os ensaios das atividades biológicas foram avaliados utilizando o extrato etanólico bruto e suas respectivas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica. Na atividade antitumoral, todos os extratos apresentaram-se ativos frente ambas as linhagens tumorais (MDA-MB-231 e A549), sendo que o mais promissor foi à fração diclorometânica, em que foi encontrada a substância hidroquinona. A atividade tripanocida, verificada frente à cepa Colombiana, também demonstrou potente atividade para todos os extratos (bruto e frações), de forma que a fração hidroalcoólica foi a mais ativa sobre a cepa de *T. cruzi*, que apresentou na caracterização fitoquímica a presença dos flavonoides quercetina e rutina. Na avaliação da atividade leishmanicida, também foi verificado potente efeito do extrato e frações frente ambas as cepas de *leishmania* (cepa M2269 de *L. amazonensis* e cepa PP75 de *L. infantum*), sendo que as frações diclorometânica e hidroalcoólica foram as mais ativas. Na atividade antimicrobiana, foi verificada que as frações inibiram às bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, no qual o mais ativo foi à fração diclorometânica. Frente os

fungos leveduriformes, a fração hexânica apresentou forte atividade antifúngica frente à cepa *C. tropicalis* e, a fração diclorometânica forte atividade antifúngica frente às cepas *C. albicans* e *C. tropicalis*, mostrando-se como as mais promissoras. Com relação à citotoxicidade sobre fibroblastos de camundongos da linhagem L929 e sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7, as frações apresentaram graus consideráveis de citotoxicidade, apresentando IS insatisfatórios, sendo a fração diclorometânica a que apresentou maior percentagem de morte celular para ambas as linhagens. Diante disso, este trabalho contribuiu para o conhecimento químico e biológico da espécie *E. erythropappus*, uma vez muitos compostos identificados nas frações são relatados pela primeira vez nesta espécie vegetal, contudo, praticamente todos estes metabólitos secundários já são descritos por demonstrarem atividade frente os ensaios propostos, exceto o palmitato de etila, o ácido linolênico e o linolenato de etila, identificados na fração hexânica e, que já são descritos por apresentarem ação antimicrobiana e antitumoral, porém, carecem de estudos frente atividades tripanocidas e leishmanicidas.

Palavras-chave: Plantas medicinais; perfil fitoquímico; atividade antitumoral; atividade tripanocida; atividade leishmanicida; atividade antibacteriana; atividade antifúngica.

ABSTRACT

The species *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish., (Asteraceae) is popularly known as Candeia and occurs naturally in the Cerrado region, including in the municipality of Diamantina, Jequitinhonha Valley and Mucuri region. In folk medicine it has been used in the treatment of stomach ulcers, such as anti-inflammatory, healing and against bacterial and fungal infections. Despite its rich biodiversity, many endemic species of this biome are still poorly studied concerning the chemical composition and biological activities. Consequently, it is necessary to invest more in research on medicinal plants, especially when dealing with diseases whose therapeutic arsenal is limited and / or treatment has limitations of efficacy and side effects, such as Chagas Disease, Leishmaniasis, Cancer and bacterial and fungal infections. Preliminary studies with about 32 plants of this region have already been carried out previously by our group and among them the species *E. erythropappus* was promising for several biological activities. Thus, it was selected and the crude ethanolic extract obtained from the aerial parts of *E. erythropappus* was initially used to obtain the hexane, dichloromethane and hydroalcoholic fractions. Their phytochemical identification showed eight secondary metabolites, belonging to the classes of acids and esters of fatty acids, terpenoid, phenolic compound and flavonoids. Preliminary the biological activities were tested to crude extract and results corroborated the previous activities observed and their fractions were sequentially also tested. In the antitumor activity evaluation, all fractions were active against both tumoral lines (MDA-MB-231 and A549) and the most promising was the dichloromethane fraction, in which hydroquinone was found. The trypanocidal activity verified against the Colombian strain was detected for fractions, but the hydroalcoholic fraction was the most active on the *T. cruzi*, which presented in the phytochemical characterization the presence of flavonoids quercetin and rutin. In the evaluation of the leishmanicidal activity, a potent effect of the extract and fractions on both *leishmania* strains (*L. amazonensis* strain M2269 and *L. infantum* strain PP75) was also verified, with the dichloromethane and hydroalcoholic fractions being the most active. In the antimicrobial activity investigation, fractions inhibited the bacteria *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*, but most active was the dichloromethane fraction. In contrast to the yeast fungi, the hexanic fraction showed strong antifungal activity against the *C. tropicalis* strain, and the dichloromethane fraction showed strong antifungal activity against the *C. albicans* and *C. tropicalis* strains. Cytotoxicity evaluation showed that both fractions presented considerable degrees of cytotoxicity against

fibroblast of mice of the L929 lineage and the RAW 264.7 macrophages, presenting unsatisfactory IS. , The dichloromethane fraction presented the highest percentage of cell death to both lines This work contributed to the chemical and biological knowledge of the *E. erythropappus* species, since many compounds identified in the fractions are reported for the first time in this plant species, however, practically all these secondary metabolites are already described because they demonstrate activity against the tests , except for ethyl palmitate, linolenic acid and ethylene linolenate, identified in the hexane fraction, and which are already described as having antimicrobial and antitumor action, but lacking studies on trypanocidal and leishmanicidal activities.

Keywords: Medicinal plants; phytochemical profile; antitumor activity; trypanocidal activity; leishmanicidal activity; antibacterial activity; antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área de ocorrência de espécies do gênero <i>Eremanthus</i> sp., conhecidas popularmente como candeia, no estado de Minas gerais (ALTOÉ 2012).....	43
Figura 2: Estrutura química do α -bisabolol.....	44
Figura 3: Exsicata <i>Eremanthus Erythropappus</i> (DC.) McLeish.....	68
Figura 4: Sistema do aparato de partição líquido-líquido.....	70
Figura 5: Delineamento das principais análises químicas a que o extrato e frações das partes aéreas da espécie <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish foram submetidas.....	71
Figura 6: Estrutura Química da Quercetina e da Rutina.....	74
Figura 7: Redução da resazurina em resorufina.....	81
Figura 8: Reação de oxi-redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT) em formazano após a conversão pela enzima succinato desidrogenas (Adaptado de RISS <i>et al.</i> , 2016).....	85
Figura 9: Representação da microplaca após redução do MTT e formação dos cristais de formazano.....	85
Figura 10: Fluxograma das etapas de obtenção do extrato bruto e suas frações, e seus respectivos rendimentos.....	89
Figura 11: Cromatograma da fração hexânica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish, obtido através da Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.....	91
Figura 12: Espectro de massas obtido pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do ácido <i>n</i> -hexadecanoico (ácido palmítico).....	93
Figura 13: Espectro de massas obtido pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do Hexadecanoato de etila (Palmitato de Etila).....	93

Figura 14: Proposta de fragmentação do palmitato de etila mostrando o fragmento oriundo do rearranjo de McLafferty.....	94
Figura 15: Espectro de massas obtido pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol).....	95
Figura 16: Espectro de massas pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do Ácido linolênico.....	96
Figura 17: Espectro de massas pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do Linolenato de etila.....	98
Figura 18: Cromatograma da fração diclorometânica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish, obtido através de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas	99
Figura 19: Espectro de massas pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química da Hidroquinona.....	100
Figura 20: Cromatograma obtido pela CLAE-UV para a fração hidroalcoólica das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish e para os padrões de referência Quercetina e Rutina.....	101
Figura 21: Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish sobre às linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.....	107
Figura 22: Avaliação da atividade antitumoral da fração hexânica de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish sobre às linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.....	108
Figura 23: Avaliação da atividade antitumoral da fração diclorometânica de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish sobre às linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.....	110
Figura 24: Avaliação da atividade antitumoral da fração hidroalcoólica de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish sobre às linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.....	112

Figura 25: Avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e suas frações das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish sobre as formas epimastigotas da cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	117
Figura 26: Avaliação da atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto das folhas e flores de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de <i>Leishmania amazonensis</i> e da cepa PP75 de <i>Leishmania infantum</i> , respectivamente.....	121
Figura 27: Avaliação da atividade leishmanicida da fração hexânica de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de <i>Leishmania amazonensis</i> e da cepa PP75 de <i>Leishmania infantum</i> , respectivamente.....	122
Figura 28: Avaliação da atividade leishmanicida da fração diclorometânica de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de <i>Leishmania amazonensis</i> e da cepa PP75 de <i>Leishmania infantum</i> , respectivamente.....	124
Figura 29: Avaliação da atividade leishmanicida da fração hidroalcoólica de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de <i>Leishmania amazonensis</i> e da cepa PP75 de <i>Leishmania infantum</i> , respectivamente.....	125
Figura 30: Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	130
Figura 31: Avaliação da atividade antibacteriana da fração hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	132
Figura 32: Avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico bruto sobre <i>Candida albicans</i> , <i>Candida Krusei</i> e <i>Candida tropicalis</i> utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	136
Figura 33: Avaliação da atividade antifúngica das frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica sobre <i>Candida albicans</i> , <i>Candida Krusei</i> e <i>Candida tropicalis</i> utilizando a	

técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....138

Figura 34: Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.....143

Figura 35: Avaliação da citotoxicidade da fração hexânica das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.....144

Figura 36: Avaliação da citotoxicidade da fração diclorometância das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.....146

Figura 37: Avaliação da citotoxicidade da fração hidroalcoólica das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.....147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características das bactérias utilizadas neste estudo e fármacos disponíveis para o tratamento das infecções bacterianas, resistências associadas, e suas características farmacológicas.....	56
Quadro 2: Características dos fungos (leveduriformes) utilizados neste estudo e fármacos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, resistências associadas, e suas características farmacológicas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de plantas nativas da região do Cerrado de Diamantina, MG.....	42
Tabela 2: Estudos das atividades biológicas de espécies de <i>Eremanthus</i> sp.....	45
Tabela 3: Classificação da Concentração inibitória Mínima (CIM) para extratos, frações e substância pura de vegetais quanto à atividade antibacteriana.....	60
Tabela 4: Classificação da Concentração inibitória Mínima (CIM) para extratos, frações e substância pura de vegetais quanto à atividade antifúngica.....	66
Tabela 5: Fase móvel em polaridade crescente utilizada na cromatografia em coluna para separação cromatográfica da fase hexânica e da fase diclorometânica do extrato etanólico de partes aéreas de <i>Eremanthus Erythropappus</i> (DC) McLeish.....	72
Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE-UV da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish.....	75
Tabela 7: Proposta de identificação de constituintes da fração hexânica do extrato etanólico das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish, por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.....	91
Tabela 8: Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish sobre células MDA-MB-231 e A549.....	105
Tabela 9: Avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish sobre as formas epimastigotas da cepa Colombiana de <i>Trypanosoma cruzi</i>	114

Tabela 10: Avaliação da atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* e da cepa PP75 de *Leishmania infantum*.....120

Tabela 11: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish frente às cepas bacterianas avaliadas através do método de microdiluição em placa, pelo método colorimétrico da resazurina.....128

Tabela 12: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish frente às cepas fúngicas avaliadas através do método de microdiluição em placa, pelo método colorimétrico da resazurina.....134

Tabela 13: Resultados da avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas da espécie vegetal *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre células L929 e RAW 264.7.....140

Tabela 14: Valores dos Índices de Seletividade (IS) do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish e seus respectivos padrões sobre células tumorais e parasitárias.....141

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

B.O.D.: Demanda Bioquímica de Oxigênio

BHI: *Brain Heart Infusion Broth*

CC₅₀: Concentração citotóxica a 50%

CCD: Cromatografia em camada delgada

CdCl₂: Cloreto de cádmio células/mL células por mililitro

CG/EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectometria de Massas

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CIPq-Saúde: Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CNPq: Conselho Nacional de Pesquisa

CO₂: Dióxido de carbono

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

HDJF: Herbário Dendrológico Jeanine Felfili

HIV: do inglês Vírus da Imunodeficiência Humana

IC₅₀: Concentração necessária para promover 50% de inibição da viabilidade

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IS: Índice de Seletividade

LC: Leishmaniose Cutânea

LEFB: Lista de Espécies da Flora do Brasil

LIMP: Laboratório de Imunoparasitologia

LIT: *Liver Infuse Tryptose*

LVA: Leishmaniose Visceral Americana

MEM: *Modified Eagle's Medium*

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MTT: *Brometo de 3-(4,3-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio*

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

NIST: *National Institute of Standards and Technology.*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: *Posphate Buffered Saline*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

UV: Ultravioleta

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

UFVJM: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

WHO: *World Health Organization*

YPD: *Yeast extract – Peptone – Dextrose*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
3.1 Produtos naturais e o tratamento de doenças.....	35
3.2 Cerrado Brasileiro.....	38
3.3 O gênero <i>Eremanthus</i> sp., e a espécie <i>Eremanthus erythropappus</i> (DC) McLeish.....	41
3.4 Doenças Humanas: aspectos gerais e limitações terapêuticas.....	45
3.4.1 Câncer.....	46
3.4.2 Doença de Chagas.....	48
3.4.3 Leishmanioses.....	51
3.4.4 Infecções Bacterianas.....	53
3.4.5 Infecções Fúngicas.....	61
4. METODOLOGIA.....	67
4.1 Material Vegetal.....	67
4.1.1 Coleta e Identificação Taxonômica.....	67
4.1.2 Preparo do Extrato Etanólico Bruto.....	69
4.2 Fracionamento do extrato etanólico bruto através de partição líquido-líquido.....	69
4.3 Processos Cromatográficos.....	72

4.3.1 Cromatografia em Coluna.....	72
4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	72
4.3.3 Cromatografia de Exclusão (Sephadex).....	73
4.3.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).....	73
4.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector Ultravioleta (CLAE-UV).....	73
4.4 Ensaios Biológicos.....	75
4.4.1 Avaliação da Atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e suas frações	76
4.4.1.1 Linhagem Celular e Manutenção.....	76
4.4.1.2 Ensaio para determinação da atividade antitumoral do extrato bruto e suas frações....	77
4.4.2 Avaliação da Atividade antitripanosomatídeos.....	77
4.4.2.1 Avaliação da atividade Tripanocida.....	78
4.4.2.1.1 Cepa e Manutenção.....	78
4.4.2.1.2 Ensaio para determinação da atividade tripanocida do extrato bruto e suas frações sobre formas epimastigotas.....	78
4.4.2.2 Avaliação da Atividade Leishmanicida.....	79
4.4.2.2.1 Cepas e Manutenção.....	79
4.4.2.2.2 Ensaio para determinação da atividade leishmanicida do extrato bruto e suas frações sob formas promastigotas.....	80
4.4.3 Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	80
4.4.3.1 Bactérias e Manutenção.....	80
4.4.3.2 Ensaio para determinação da atividade antibacteriana do extrato bruto e suas frações.....	81

4.4.4	Avaliação da Atividade Antifúngica.....	82
4.4.4.1	Fungos Leveduriformes e Manutenção.....	82
4.4.4.2	Ensaio para determinação da atividade antifúngica do extrato bruto e suas frações...	82
4.4.5	Avaliação da Citotoxicidade.....	83
4.4.5.1	Linhagem Celular e Manutenção.....	83
4.4.5.2	Ensaio para determinação da citotoxicidade do extrato bruto e suas frações.....	84
4.5	Parâmetros para avaliação das atividades biológicas promissoras: determinação e avaliação da IC ₅₀ , do Índice de Seletividade (IS) e da Eficácia.....	86
4.6	Análise estatística.....	87
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
5.1	Análise Fitoquímica.....	88
5.1.1	Obtenção do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações.....	88
5.1.2	Análise e identificação de substâncias a partir das frações.....	89
5.1.2.1	Fase Hexânica.....	90
5.1.2.1.1	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).....	90
5.1.2.2	Fase Diclorometânica.....	98
5.1.2.2.1	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).....	98
5.1.2.3	Fase Hidroalcoólica (porção aquosa remanescente).....	100
5.1.2.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector Ultravioleta (CLAE-UV).....	100
5.2	Avaliação das Atividades Biológicas.....	103
5.2.1	Avaliação da Atividade Antitumoral do extrato etanólico bruto e suas frações.....	103

5.2.2 Avaliação da Atividade Tripanocida do extrato etanólico bruto e suas frações.....	113
5.2.3 Avaliação da Atividade Leishmanicida do extrato etanólico bruto e suas frações.....	119
5.2.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana do extrato etanólico bruto e suas frações.....	126
5.2.5 Avaliação da Atividade Antifúngica do extrato etanólico bruto e suas frações.....	133
5.2.6 Avaliação da Citotoxicidade do extrato etanólico bruto e suas frações.....	139
6. CONCLUSÕES.....	150
7. PERSPECTIVAS.....	154
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
ANEXO A.....	196
ANEXO B.....	197

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma estratégia antiga utilizada pela população como forma terapêutica para a cura e a prevenção de várias enfermidades (PATEL *et al.*, 2018; RAJ *et al.*, 2018). Antes do século XX, 80% das alternativas terapêuticas que eram utilizadas para tratamento de doenças humanas e/ou animais eram obtidos a partir de partes de plantas medicinais, tais como folhas, cascas e raízes (OGBOLE, SEGUN & ADENIJI 2017). O uso destas ervas pela medicina popular desempenham um papel importante na sociedade humana, representando uma fonte significativa para busca, avaliação e desenvolvimento de medicamentos em várias partes do mundo (REIS *et al.*, 2018).

Apesar de geralmente não se conhecerem os metabólitos ativos presente nas plantas medicinais, seu uso popular desde antiguidade, serve para selecionar e dirimir estudos científicos para validar os prováveis efeitos terapêuticos destas plantas e avaliar também sua toxicidade (RAJ *et al.*, 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que cerca de 80% das pessoas em todo o mundo dependem direta ou indiretamente da medicina tradicional ou da fitoterapia para o tratamento de enfermidades (PATEL *et al.*, 2018; FATIMA, KANWAL & MAHMOOD 2018). Consequentemente, a exploração, utilização e conservação desses recursos etnobotânicos é essencial para a restauração e preservação do conhecimento tradicional e ecológico (PATEL *et al.*, 2018; RAJ *et al.*, 2018; FATIMA, KANWAL & MAHMOOD, 2018).

Em decorrência desta realidade, atualmente, há uma grande variedade de pesquisas em torno de plantas medicinais voltadas à busca de novos fármacos. Contudo, estima-se que somente cerca de 20% do arsenal botânico mundial disponível encontra-se em estudo (SUFFREDINI *et al.*, 2004). Além disso, estima-se que na atualidade, 1/3 dos medicamentos utilizados pela população são obtidos de recursos naturais à base de plantas. Nas últimas décadas, os químicos e farmacêuticos fabricaram vários medicamentos de origem vegetal, com resultados efetivos e seguros (BRITO *et al.*, 2015; ALEEBRAHIM-DEHKORDY, *et al.*, 2017), tais como Cardcor®, Eparema®, Tamarine®, Pasalix®, Metamucil®, Tebonin®, etc. (FILHO 2015; FERREIRA, *et al.* 1998). Em conjunto esses dados mostram claramente o papel promissor das plantas como fontes para novos recursos terapêuticos para doenças cujo tratamento apresenta limitações quanto à eficácia, segurança ou disponibilidade de recursos.

O Brasil possui uma grande biodiversidade natural, é detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, além de hospedar entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, reunindo o maior número de espécies endêmicas do mundo (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Essa biodiversidade está distribuída em seis grandes biomas predominantes, sendo o Cerrado, a Caatinga, a Floresta Amazônica, os Campos e Florestas Meridionais, a Floresta Atlântica, e o Pantanal (RIBEIRO & WALTER, 2008), sendo que a maioria das plantas medicinais comercializadas no Brasil são oriundas de outros países.

Dessa forma, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas e representam um potencial campo de pesquisa acadêmica para desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (PINTO *et al.*, 2002). Mesmo diante da grande diversidade da flora brasileira e de sua limitação referente à caracterização química e potencial farmacológico, o país ainda necessita de maiores investimentos em pesquisas com plantas, uma vez que a biodiversidade brasileira é extremamente abundante, sendo importante como fonte de insumos para pesquisa, desenvolvimento e produção de novos fármacos para o tratamento de inúmeras enfermidades. Neste contexto, o Cerrado, vegetação típica da região do Vale do Jequitinhonha é uma rica fonte natural, representando o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia. Em decorrência da maior diversidade filogenética observada entre as plantas deste bioma, é provável que exista um amplo espectro de substâncias bioativas disponíveis nas espécies pertencentes a este bioma (MENDONÇA *et al.*, 1998; BORLAUG, 2002; KLINK & MACHADO, 2005).

Existem vários registros de espécies vegetais pertencentes ao bioma Cerrado, dos quais a população faz uso tradicional, por exemplo, a *Stryphnodendron adstringens* Mart., conhecida como barbatimão, é usada popularmente como cicatrizante, antisséptico, anti-inflamatório, hemostático, antiedematogênico, entre outros (BALDIVIA *et al.*, 2018; PEREIRA, MORENO & CARVALHO, 2013). A *Arrabidaea brachypoda* (DC.), conhecida como "cipó-una" ou "cervejinha do campo", é popularmente usada para o tratamento de cálculos renais e articulações dolorosas (artrite) (RESENDE *et al.*, 2017). A *Alibertia edulis* Rich., espécie também pertencente a este bioma, tradicionalmente conhecida como "marmelo do Cerrado", possui alto potencial alimentício e ornamental e as folhas são utilizadas para preparo de chá que é

empregado como hipoglicemiantes, anti-hipertensivo e diurético (MENEGATI *et al.*, 2016). A *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish, comumente conhecida como “candeia”, tem sido usada na medicina tradicional como agente antimicrobiano, antiulceroso, cicatrizante e anti-inflamatório (SILVÉRIO, 2004; ROSAL *et al.*, 2007).

Diante disso, considerando a grande biodiversidade da região do Vale Jequitinhonha, o objetivo deste trabalho foi estudar a planta *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish, pertencente à família Asteraceae, caracterizando-a mais detalhadamente do ponto de vista químico e validando as atividades biológicas observadas em estudos de triagem realizados com extratos brutos desta espécie. Estudos preliminares com plantas desta região já foram realizados anteriormente pelo nosso grupo, e dentre elas a espécie *E. erythropappus*, se mostrou promissora por apresentar importantes atividades antitumoral, tripanocida, leishmanicida e antifúngica (CUNHA, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar atividades biológicas da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish, pertencente ao bioma Cerrado, proveniente do município de Diamantina/MG, inserido na região do Vale do Jequitinhonha.

2.2 Objetivos Específicos

- Fracionar o extrato etanólico bruto e propor a identificação de substâncias com o emprego de diferentes técnicas cromatográficas.
- Avaliar a atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas (folhas e flores) da espécie *E. erythropappus*.
- Avaliar a atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas (folhas e flores) da espécie *E. erythropappus*.
- Avaliar a atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas (folhas e flores) da espécie *E. erythropappus*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas (folhas e flores) da espécie *E. Erythropappus* (DC).
- Avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas (folhas e flores) da espécie *E. erythropappus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos naturais e o tratamento de doenças

Na natureza, existe uma abundância de recursos vegetais, os quais possuem inúmeras propriedades biológicas intrínsecas, que são “bem conhecidas” por suas aplicações na medicina tradicional por séculos. Entretanto, apesar desta prática é necessário considerar que o uso dessas plantas medicinais não é sinônimo de inocuidade. Ao contrário da crença popular de que “medicamento natural se não fizer bem, mal não faz” a planta medicinal é um xenobiótico, ou seja, é um produto desconhecido quimicamente, não conhecido ao organismo, e que possui propriedades terapêuticas ou intoxicantes, nos quais, ao ser introduzido no organismo humano, pode passar por biotransformações e, desta forma, poderá gerar produtos tóxicos ao organismo (KHWAIRAKPAMA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Consequentemente, tanto a atividade farmacológica quanto a segurança do uso destes produtos deve ser avaliado cientificamente, a fim de validar sua atividade terapêutica e minimizar o risco a saúde. Uma estratégia que tem obtido sucesso na identificação de novas moléculas bioativas a partir de diversas plantas é a abordagem etnobotânica, que se preocupa em resgatar e valorizar o conhecimento tradicional, além de destacar a diversidade cultural dessas sociedades e sua relação com as plantas medicinais, que podem servir como indicativo de potencial atividade farmacológica das mesmas (BENZ *et al.*, 2000; HEINRICH, 2000; LADIO & LOZADA, 2004). Nessa abordagem, a informação apresentada pelas comunidades que fazem uso destas plantas associada aos estudos fitoquímicos e biológicos representam avanços na investigação de produtos bioativos e tem produzido resultados positivos para a descoberta potencial de novas alternativas terapêuticas (MELO *et al.*, 2011).

O uso de plantas medicinais é sem dúvida uma promissora alternativa para o descobrimento de novos fármacos, que podem ser mais eficazes e seguros, uma vez que o uso de espécies vegetais vem sendo feito desde o início das civilizações no processo de cura de várias doenças (DODDAPANENI *et al.*, 2018; NAKAMURA *et al.*, 2006). Planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que apresenta substâncias ativas que podem ser usadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (OMS 2002) ou fornecedoras de fitofármacos. Estes princípios ativos, também chamados de metabólitos secundários, geralmente, são conhecidos por apresentarem atividades biológicas interessantes do ponto de vista farmacêutico, por apresentarem efeitos farmacologicamente (terapeuticamente) importantes, e que devem ser avaliados. Logo, o isolamento e identificação de compostos bioativos a partir de plantas é de grande interesse para os

pesquisadores, a fim de obter o desenvolvimento e produção de novos medicamentos com eficácia e segurança para resolver problemas inerentes ao tratamento de várias doenças crônicas, degenerativas e/ou parasitárias. As principais classes de metabólitos secundários encontrados nas plantas são os: taninos, os alcalóides, as cumarinas, as antraquinonas, os flavonóides, as lactonas, os sesquiterpenos; entre outros (SHIN, PRABHAKARAN & KIM, 2018; TAVAKOLI *et al.* 2017; BASTOS, 2007).

Diante disso, a análise fitoquímica realizada em plantas com uso medicinal é uma etapa importante no desenvolvimento de novos fármacos, principalmente, quando as espécies analisadas não apresentem estudos químicos. A análise fitoquímica busca conhecer os constituintes químicos da planta, e identificar os grupos de metabólitos secundários ali presentes (BEZERRA *et al.*, 2018; CORONADO-ACEVES *et al.*, 2017; SIMÕES *et al.*, 2007).

Tanto a elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, são uns dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. Quando se obtém um extrato de uma planta, o mesmo apresenta inúmeros constituintes, e quando testado pode apresentar atividades biológicas revelantes, cujos efeitos podem ser oriundos do sinergismo entre os diferentes princípios ativos nele presentes, uma vez que o extrato pode apresentar compostos de classes ou estruturas diferentes, que podem contribuir para uma mesma atividade. Quando se realiza estudos biológicos de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico que se deseja buscar. Além disso, os protocolos de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis (MACIEL, PINTO & VEIGA JR. 2002).

Os metabólitos secundários são amplamente distribuídos nos vegetais. Eles têm sido conhecidos por apresentarem efeitos benéficos sobre a saúde humana e, por apresentarem diversas atividades promissoras em ensaios biológicos. Na literatura, muitos estudos demonstram a potencialidade da ação farmacológica de muitas espécies de plantas, incluindo diversas atividades, tais como antitumoral (LEE *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; SYLVESTRE *et al.*, 2006; MACHADO & MELO-JUNIOR, 2009); anti-inflamatória (SOARES *et al.*, 2006; LORENZI & MATOS, 2002; PUPO *et al.*, 2008), analgésica (OLIVEIRA, 2011; SOARES *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2006); leishmanicida (REIS *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2011); tripanocida (MOREIRA *et al.*, 2013; MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013; SULSEN *et al.*, 2006); antibacteriana e antifúngica (PENNA *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2018, DEUS *et al.*, 2011; DINIZ

et al., 2010), dentre outras. A crescente busca de novos fármacos a partir de produtos naturais se faz devido aos diversos problemas relacionados com a terapêutica das doenças humanas, seja das doenças parasitárias, as infecciosas causadas por bactérias e fungos, os cânceres, entre outros, dos quais estas enfermidades carecem de terapias que sejam mais eficazes e menos tóxicas ao usuário (DE PAULA *et al.*, 2003; FENNER *et al.*, 2006; YAACOB *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011). Contudo, a maioria dos produtos naturais à base de plantas comercializadas no mercado não foi submetida a ensaios clínicos rigorosos e seus efeitos colaterais potenciais são, portanto, pouco conhecidos (KONCIC, 2017). Assim, mais investimentos e pesquisas no intuito de avaliar e validar os efeitos destes produtos são necessários.

Segundo CARIBÉ (2008), o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, estimando-se aproximadamente 20% do total de todas as espécies vegetais do mundo. Esse imensurável patrimônio natural tem um valor muito importante, principalmente no campo farmacêutico, que apresenta seu maior potencial e suas maiores expectativas (CALIXTO, 2003). Dentro desta rica biodiversidade, o Cerrado representa o segundo maior bioma brasileiro, e maior área de savana da América do Sul. Ele ocupa cerca de dois milhões de km² no território nacional, sendo considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica (DANTAS, *et al* 2018; OLIVEIRA, *et al.*, 2018; ANACHE, *et al.*, 2018; NETO & MORAIS, 2003).

Segundo BRANDÃO e colaboradores (2012), estudos realizados por naturalistas europeus no estado de Minas Gerais no século XIX, mostraram a presença de plantas medicinais na região do Cerrado, onde os mesmos viajaram e registraram o uso tradicional de mais de 500 espécies vegetais neste estado. No mesmo estudo, foi relatado ainda, que no norte de Minas Gerais, do qual o bioma predominante é o Cerrado, e em outros estados do país como Bahia, Alagoas, Pernambuco, Ceará, Piauí e Goiás, foram coletados centenas de amostras de plantas, em que se registrou o uso medicinal de várias delas, e que o Cerrado era ainda inexplorado.

Em outro estudo, o naturalista francês Saint-Hilaire descreveu o uso de várias espécies vegetais nativas do Brasil em uma obra literária, dos quais foram descritos os inúmeros usos que os colonos faziam das plantas, entre eles o medicinal, e ressaltou ainda a necessidade de realização de estudos científicos destas plantas, atestando a eficácia das espécies medicinais usadas no país. Dentre estas espécies, o francês Saint-Hilaire descreveu quinze plantas na região norte/nordeste de Minas Gerais, inclusive da região da atual Diamantina (SAINT-HILAIRE, 2009).

Recentemente, OLIVEIRA (2016) e Cunha (2016), avaliando preliminarmente extratos de 32 plantas da região do Cerrado, verificaram ponteciais atividades antitumoral, leishmanicida, tripanocida, antibacteriana e antifúngica para várias plantas da região. Por conseguinte, fica evidente a necessidade de maiores subsídios para pesquisas na área de produtos naturais, objetivando o desenvolvimento de fármacos, explorando a rica biodiversidade desta região.

3.2 Cerrado Brasileiro

O Cerrado, também conhecido como Savana brasileira é considerada uma das regiões mais importantes do Brasil, e uma das mais ricas savanas do mundo, que compreende desde plantas lenhosas (como as árvores e os arbustos) até herbáceas, caracterizando a região como singular e diversificada (SCHIASSI *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2016; PAGOTTO & SOUZA, 2006). As árvores deste bioma são geralmente baixas, apresentando troncos retorcidos e tortuosos, com casca espessa e protegidas por uma camada de cortiça (SENNA, 2006).

Este bioma apresenta uma das maiores floras vegetais do mundo, com um cenário de extraordinária diversidade biológica, e com aproximadamente 10.000 espécies de plantas medicinais que contém produtos naturais para fitoterapia (RIBEIRO *et al.*, 2018; VILA VERDE *et al.*, 2003). Entretanto, apesar dessa imensurável riqueza vegetal, o Cerrado é uma das 35 regiões consideradas como *hotspots* de biodiversidade. Ou seja, embora apresente uma grande biodiversidade, sendo rica em espécies endêmicas, tem alto grau de ameaça, principalmente, devido à expansão das atividades agrícolas, gerando desta forma, um enorme risco de perda de plantas com potencial uso medicinal. Essas áreas são, portanto, locais que necessitam de atenção urgente, sendo consideradas prioritárias nos programas de conservação (JESUS, PEDRO & BISPO, 2017; GUIMARÃES, RODRIGUES & MALAFAIA, 2017; MMA, 2011).

Espécies vegetais como a *Staurogyne warmingiana* Hiern., a *Gomphrena hatschbachiana* Pedersen., a *Pfaffia argyrea* Pedersen., a *Metastelma harleyi* Fontella., a *Attalea brasiliensis* Glassman., e a *Hyptis imbricatiformis* Harley., são exemplos de plantas que ocorrem no Cerrado e que constam na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014). Neste contexto, o Cerrado brasileiro, abriga cerca

de 11.627 espécies de plantas nativas e já catalogadas (MMA, 2018), sendo de grande importância preservar e conhecer a sua biodiversidade, de forma que seu potencial químico e biológico possa ser investigado e explorado de forma racional (FUNARI & FERRO, 2005; ROLIM, 2009; ALBERNAZ, *et al.*, 2010).

O Cerrado é encontrado na região de Diamantina/MG, inserida na macrorregião do Vale do Jequitinhonha e, alguns estudos confirmam o uso na medicina popular de algumas espécies oriundas desta região, como a *Ageratum fastigiatum* Gardn., empregada no tratamento antiinflamatório, cicatrizante, analgésico e antimicrobiano (LORENZI & MATOS, 2002; CARVALHO, 2004, DELVECHIO *et al.*, 2007); a *Gomphrena virgata* Mart., empregada no tratamento de dores, inflamações e infecções, sendo a forma mais utilizada o infuso das raízes (OLIVEIRA, 2011); *Croton antisiphiliticus* Mart., empregada no tratamento de sífilis, inflamações, infecções genitais, cânceres, antirreumática e antibacteriana (VILA VERDE *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012; MESSIAS *et al.*, 2015); e a *Plectranthus neochilus* Schltr., tradicionalmente utilizada para o tratamento de insuficiência hepática, dispepsia e dores no estômago (ROSAL, 2008).

Vários estudos comprovam cientificamente o potencial de plantas provenientes do Cerrado como fontes de novas alternativas terapêuticas para várias doenças, incluindo as doenças parasitárias, infecções e cânceres. Algumas espécies de plantas deste bioma já apresentam estudos quanto o seu potencial bioativo, como exemplo, a *Kielmeyera lathrophyton* Saddi. que apresentou potencial leishmanicida e antibacteriano (DE TOLEDO *et al.*, 2011), a *Lafoensia pacari* A.St.-Hil., a *Gomphrena arborescens* Mart. e a *Byrsonima verbascifolia* Rich. apresentaram atividades anti-inflamatória (SOLON *et al.*, 2000; MESSIAS *et al.*, 2015; RODRIGUES & CARVALHO, 2001); antimicrobiana (DE LIMA *et al.*, 2006; MESSIAS *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2011); antitumoral e tripanocida (GUIMARÃES *et al.*, 2010; PANIZZA, 1998; ESPANHA *et al.*, 2014); a *Campomanesia adamantium* Cambess., a *Eryngium horridum* Malme., a *Cissampelos ovalifolia* DC. e a *Banisteriopsis oxyclada* A. Juss. apresentaram atividades antitumoral, tripanocida, leishmanicida e antifúngica (CUNHA 2016); a *Ageratum fastigiatum*, a *Myrsine emarginella* Miq., a *Qualea dichotoma* Mart. e a *Agarista oleifolia* Judd. apresentaram atividade antitumoral, tripanocida, leishmanicida e antibacteriana (OLIVEIRA, 2016).

Esses dados reforçam a necessidade de se estudar ainda mais as plantas da região do Cerrado, tendo em vista a possibilidade de encontrar novas substâncias bioativas menos tóxicas, mais seguras e eficazes. Dessa forma, considera-se que esta região pode apresentar plantas com potencial para o tratamento de doenças humanas cujo tratamento apresenta

limitações terapêuticas, como cânceres, infecções bacterianas e fúngicas bem como doenças causadas por protozoários como a Leishmaniose e Doença de Chagas, que representam importantes problemas de saúde pública nesta região e no Brasil.

Neste contexto, nosso grupo tem investigado várias plantas da região de Cerrado da região do Vale do Jequitinhonha quanto a essas atividades e, muitas se mostraram promissoras nos testes iniciais de triagem de atividades biológicas (CUNHA 2016; OLIVEIRA 2016). Entre elas, a *Acrocomia aculeata* Jacq. apresentou promissora atividade antitumoral, tripanocida e leishmanicida. Ao ser avaliado o seu extrato etanólico bruto das folhas, o mesmo apresentou potente atividade antitumoral frente à linhagem MDA-MB-231, com redução da viabilidade celular que variou entre 96,77 a 59,87%, e IC₅₀ de 193,4 µg/mL. Na atividade antiparasitária, o extrato apresentou percentual de morte parasitária de 78,36 a 72,29% frente à cepa colombiana de *T. cruzi*, com IC₅₀ de 366,3 µg/mL, e de 65,18 a 58,61% de morte frente à cepa BH46 de *Leishmania*, com IC₅₀ de 48,3 µg/mL, mostrando desta forma, o potencial efeito tripanocida e leishmanicida desta espécie. Outra planta avaliada que apresentou potencial atividade biológica foi a espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish; o seu extrato etanólico bruto das folhas demonstrou significativa ação antitumoral, tripanocida e leishmanicida. Em relação à atividade antitumoral, o mesmo apresentou uma % de morte das células MDA-MB-231 que variou de 97,19 a 97,49%, sendo ativo nas concentrações de 1000 a 250 µg/mL. Em relação à atividade tripanocida, o extrato bruto mostrou-se significativamente ativo frente às formas epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, com uma redução dos parasitos que variou de 65,42 a 61,62%, sendo ativo também nas concentrações de 1000 a 250 µg/mL. Para a atividade leishmanicida, foram avaliadas duas cepas de *Leishmania* (M2269 e BH46), no qual o extrato bruto desta espécie vegetal reduziu a viabilidade destas duas cepas, com porcentagem de morte de 78,52 e 76,41% para as concentrações de 1000 e 500 µg/mL, respectivamente frente à cepa M2269, e redução de 79,71 a 70,75% entre as concentrações ativas que foram de 1000 a 250 µg/mL frente à cepa BH46, mostrando o potencial efeito antiparasitário desta espécie.

Diante disso, observando o potencial que as espécies vegetais do Cerrado da região do Vale do Jequitinhonha apresentam, o intuito deste trabalho foi dar prosseguimento aos estudos fotoquímicos e biológicos da *Eremanthus erythropappus*, uma vez que esta espécie apresentou promissora atividade biológica no teste de triagem.

3.3 O gênero *Eremanthus* sp., e a espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish

O gênero *Eremanthus* compreende aproximadamente 27 espécies, que podem ser encontradas nos domínios dos Cerrados brasileiros, distribuídos nos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia, com duas espécies (*Eremanthus mattogrossensis* e *Eremanthus. rondoniensis*) encontradas também na Bolívia (PINTO 2016; ARAÚJO 2015). São endêmicas dos cerrados e campos rupestres do Planalto Central Brasileiro, cujos representantes são arvoretas, árvores, e mais raramente arbustos. As espécies deste gênero são conhecidas popularmente como candeia da serra, ou apenas candeia, devido a sua capacidade de queimar facilmente (AMARAL 2008). Essa espécie se desenvolve sobre solos pouco férteis, rochosos e rasos originando povoamentos puros, denominados de monodominantes (PINTO 2016; FARIA 2012). Além destes locais, sua ocorrência também é registrada dentro de florestas após alguma perturbação com consequente formação de clareiras, visto que é heliófila. A candeia apresenta alto potencial econômico, sendo que sua madeira apresenta alta durabilidade e resistência podendo ser empregada como moirões e também na construção civil. Das diferentes espécies desse gênero, pertencentes à família Asteraceae, as principais representantes encontradas são a *Eremanthus erythropappus* (DC) Macleish, a *Eremanthus incanus* (Less.) Less. e a *Eremanthus glomerulatus* Less. (PINTO 2016). Em Minas Gerais, as espécies *E. erythropappus* e *E. incanus* apresentam maior importância econômica.

Como em diferentes regiões do Brasil, a população da região do Vale Jequitinhonha, em especial o município de Diamantina (MG), a população recorre também às plantas nativas como fonte terapêutica, devido à tradição, à dificuldade de acesso geográfico de certos povoados aos centros urbanos e/ou ainda à falta de recursos financeiros para a aquisição de medicamentos industrializados.

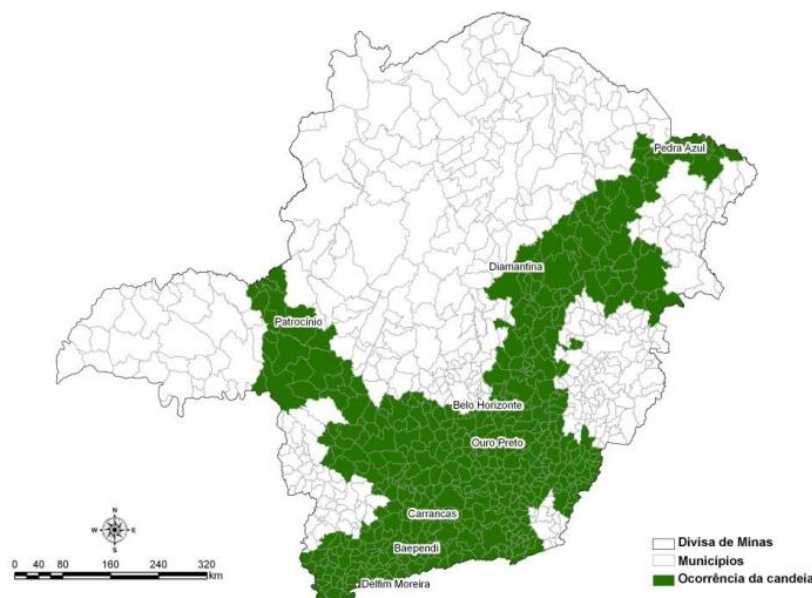
Na tabela 1, são descritas informações de plantas da região do Cerrado de Diamantina, Minas Gerais, usadas na medicina tradicional para tratamento de várias enfermidades.

Tabela 1: Espécies de plantas nativas da região do Cerrado de Diamantina, MG.

Planta	Nome Popular	Uso Popular	Referências
<i>Ageratum fastigiatum</i> Gardner	Matapasto	Inflamações, cicatrizante	LORENZI & MATOS (2002)
<i>Gomphrena virgata</i> Mart.	Cangussú branco	Dores, inflamações e infecções	OLIVEIRA (2011)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.) McLeish	Candeia da serra	Infecções, úlceras estomacais e inflamações	SILVÉRIO (2008); ROSAL <i>et al.</i> , (2007)
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	Boldinho ou Boldo rasteiro	insuficiência hepática, dispepsia e dores no estômago	ROSAL (2008)
<i>Cayaponia espelina</i> Cogn.	Cipó Azogue taiuiá	Tônico, diurético, purgativo, reumatismo.	LEMES <i>et al.</i> , (2011).
<i>Croton antisiphiliticus</i> Mart.	Pé-de-perdiz, alcanforeira	Tratamento de sífilis, inflamação, infecções genitais e cânceres	VILA VERDE <i>et al.</i> , (2003); DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , (2011).

Dentre estas espécies descritas, encontram-se a espécie *E. erythropappus*, nativa do Brasil, pertencente à família Asteraceae, que apresenta grande importância econômica e medicinal. Ela é endêmica do Brasil, é predominante no Cerrado e Mata atlântica, com ocorrência na região sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo) e centro-oeste do país (Goiás e Distrito Federal). Em Minas Gerais, se concentra numa ampla faixa do nordeste ao sul do estado e segue em sentido oeste (Figura 1) (LOEUILLE *et al.*, 2015).

Figura 1: Área de ocorrência de espécies do gênero *Eremanthus* sp., conhecidas popularmente como candeia, no estado de Minas gerais.



Fonte: ALTOÉ, 2012.

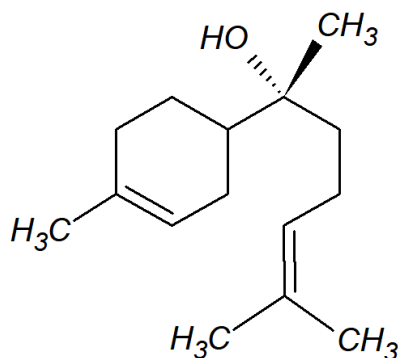
Esta espécie tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias, como cicatrizante e no tratamento de úlceras estomacais (FARIA 2012; DUTRA *et al.*, 2010; SILVÉRIO *et al.*, 2008).

Esta planta é considerada precursora na invasão de campos, desenvolvendo-se rapidamente em campos abertos. Tem capacidade de se desenvolver em locais onde os solos são pouco férteis, rasos e, sua maior predominância, ocorre em regiões de campos de altitude, que pode variar de 400 a 2.200 m (ARAÚJO 2015; PINTO 2016). Essa importante característica da candeia permite que ela se desenvolva em locais dos quais seria difícil a implantação de áreas rurais ou, mesmo, a implantação de alguma outra espécie florestal.

Considerando a constituição química da família Asteraceae, esta é caracterizada, principalmente, pela produção de substâncias como as lactonas sesquiterpênicas, sendo relatadas na literatura mais de 4.000 moléculas desse metabólito secundário em várias tribos desta família (EMERENCIANO *et al.*, 1998). Flavonóides também foram identificados em espécies desta família, assim como terpenoides, que podem ser substâncias úteis para tratamento de doenças infecciosas e parasitárias (NIJVELDT, 2001; AMBRÓSIO *et al.*, 2008; ELSHARKAWY & ALSHATHLY, 2013). As espécies do gênero *Eremanthus* possuem uma substância já conhecida e isolada, o α -bisabol (Figura 2), encontrado principalmente no óleo essencial e que apresenta propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, cicatrizante e hidratante (SCOLFORO *et al.*, 2016; FARIA 2012), sendo utilizado na indústria

farmacêutica e de cosméticos, principalmente na forma de pomadas, géis e loções (SCOLFORO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; MELO 2012).

Figura 2: Estrutura química do α -bisabolol



LOBO e colaboradores (2012) ao realizarem o perfil químico de espécies do gênero *Eremanthus*, observaram uma predominância de sesquiterpenos, lactonas e flavonoides. No óleo essencial são encontrados compostos como ácido isovalérico, β -bisaboleno, dióis de bisaboleno, óxido de bisabolol B, eremantina, lichnopholido e principalmente o α -bisabolol. Este último é um composto já isolado e utilizado comercialmente, sendo encontrado em vários produtos com ação anti-inflamatória em todo o mundo (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Segundo RIBEIRO e SERAVALLI (2004), os flavonoides compõem uma classe importante de pigmentos naturais encontrados com frequência na natureza, unicamente em vegetais. Tais compostos apresentam uma série de características farmacológicas, tais como: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras (LOPES *et al.*, 2003).

Corroborando esse potencial, extratos, frações ou substâncias isoladas de várias espécies do gênero *Eremanthus* apresentaram atividades biológicas, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Estudos das atividades biológicas de espécies de *Eremanthus* sp.

Espécie	Extrato e substância ativa	Atividade biológica	Referências
<i>Eremanthus crotonoides</i> (DC.) Sch. Bip.	- Extrato etanólico das folhas secas	Antitumoral	LOBO <i>et al.</i> , (2012)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (DC.)	- Óleo essencial das folhas	Antifúngico	SILVÉRIO <i>et al.</i> , (2013)
	- Extrato etanólico dos galhos	Anti-inflamatório	SILVÉRIO <i>et al.</i> , (2008)
	- Extrato diclorometano e hexânico dos ramos	Schistosomicida	ALMEIDA <i>et al.</i> , (2012)
	- Óleo essencial das folhas	Antibacteriano	SOUSA <i>et al.</i> , (2008)
<i>Eremanthus elaeagnus</i> (DC.)	- Substância isolada Eremantina	Schistosomicida	VICHNEWSKI & GILBERT (1972)

SOUSA e colaboradores (2008) mostraram atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* frente às cepas de *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp e *C. albicans*. Em outro estudo, ALMEIDA *et al.*, (2012) observaram atividade schistosomicida do extrato diclorometano e hexânico dos ramos de *E. erythropappus* nas concentrações de 100 e 200 mg/mL. A atividade foi detectada a partir da ausência de motilidade do parasita, incapacidade de adesão em cultura em placa e ausência de ovos em meio de cultura..

Diante desses resultados, o presente trabalho pretendeu identificar alguns componentes químicos desta espécie e, posteriormente, tentar validar tais atividades biológicas observadas com o extrato bruto e em suas frações, a fim de avaliar quais componentes responsáveis por tais atividades e tentar reduzir a toxicidade, em trabalhos futuros.

3.4 Doenças Humanas: aspectos gerais e limitações terapêuticas

Atualmente, varias doenças, tanto as infecto-parasitárias como a Doença de Chagas, as leishmanioses, ou infecções bacterianas e fúngicas; bem como as doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, são objetos de grande relevância no que tange a discussão de saúde pública mundial (BEER, *et al.*, 2016; MOLINA-GRAZA., 2014; ALEEBRAHIM-

DEHKORDY *et al.*, 2017; CORREIA *et al.*, 2016). Essa realidade está relacionada ao escasso número de fármacos geralmente disponíveis e/ou problemas que estes fármacos induzem, principalmente, relacionados à eficácia, toxicidade, resistência e/ou efeitos colaterais associados ao seu uso, fatores que comprometem o sucesso do tratamento (MIERI *et al.*, 2017; CUNHA, 2016), tornando-se urgente a busca por novos agentes terapêuticos para tratá-las, que possam ser menos tóxicos e mais efetivos para estas doenças.

Diante disso, considerando as limitações apresentadas no tratamento das doenças infecciosas e do câncer, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, sendo as plantas uma importante fonte de novos agentes com potencial farmacológico, em que a elucidação de metabólitos secundários derivados de plantas é um campo em crescente expansão, principalmente quando as espécies vegetais em estudo já são usadas na medicina tradicional (ADAM *et al.*, 2018; FORMISANO *et al.*, 2017; PERSIA, *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, os produtos naturais têm desempenhado um papel crucial como agentes terapêuticos de várias enfermidades, tanto em suas formas naturais ou sinteticamente modificados, por exemplo, alguns fármacos de origem vegetal como o paclitaxel, a vimblastina, a vincristina, a camptotecina já tem sido empregados no tratamento do câncer, estimando-se que aproximadamente 60% dos fármacos antitumorais utilizados no mercado são oriundos de fontes naturais (XU *et al.*, 2015; NASCIMENTO, 2014). Outras duas substâncias (quitina e artemisina), também derivadas de espécies vegetais, já são usadas no tratamento antimalárico (FIDOCK *et al.*, 2004; SOH & BENOIT-VICAL, 2007).

A seguir, serão abordados alguns aspectos biológicos, epidemiológicos, bem como algumas limitações terapêuticas de tratamento de enfermidades, cujo potencial de plantas referentes às atividades antitumorais, antiparasitárias, e antimicrobianas para as mesmas foram investigadas no presente estudo.

3.4.1 Câncer

O câncer pode ser definido como uma enfermidade decorrente do crescimento desordenado de células, que se multiplicam incontrolavelmente (INCA, 2012), tendendo a invadir tecidos e órgãos vizinhos. São descritos mais de duzentos tipos diferentes associados a anormalidades em diferentes tipos de células existentes no corpo humano. Por exemplo, se o câncer tem origem em tecidos epiteliais como pele ou mucosa é caracterizado carcinoma; se inicia em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é denominado sarcoma (JUNIOR, 2007).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, é um dos problemas mais importantes relacionados às ciências médicas, sendo, portanto, um grande desafio para os sistemas de saúde. Tem-se observado um aumento da morbidade relacionada à ocorrência de câncer em uma escala global, demonstrando que as medidas terapêuticas existentes contra o mesmo precisam ser complementadas por novos agentes com eficácia melhorada e menor toxicidade adversa. Devido à natureza heterogênea do câncer, não existe um tratamento universal, mas o tratamento é baseado em quatro abordagens gerais diferentes, que podem ser aplicados sozinho ou em combinação, que são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia (OCHWANG'I *et al.*, 2018; ALEEBRAHIM-DEHKORDY *et al.*, 2017; BUYEL, 2018).

Segundo BUYEL (2018), a cada ano são relatados mais de 14 milhões de novos casos de câncer e, estima-se que o número de casos deverá aumentar em 26% nos próximos 35 anos devido a mudanças demográficas e diagnósticos aprimorados. Em relação aos índices de mortalidade do câncer, o mesmo saltou de 6,2 para 8,8 milhões entre 2003 e 2015 (OMS 2017), o que equivale a aproximadamente 13% de todas as mortes em todo o mundo. O número de casos é maior nos países em desenvolvimento devido a condições socioeconômicas que restringem o acesso a terapias adequadas.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta o câncer como a segunda maior causa de morte por doença no país, sendo as regiões sul e sudeste detentoras das maiores taxas de incidência. Estima-se, entre os anos de 2018-2019, uma incidência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano no Brasil, dos quais 68 mil devem ser cânceres de próstata, 60 mil de mama e, principalmente, o câncer de pele não melanoma, em que estima-se que serão cerca de 170 mil novos casos, serão os mais frequentes (INCA 2018).

As classes de agentes antineoplásicos/quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais e os inibidores mitóticos (SCHULZE, 2007; INCA, 2018b). Porém, apesar de várias alternativas terapêuticas existentes e de intensivos investimentos em pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos, uma droga antineoplásica ideal ainda não foi descoberta, uma vez que numerosos efeitos adversos e às vezes baixa eficácia em alguns tipos de câncer limitam o tratamento (CARVALHO *et al.*, 2015).

Neste contexto, uma saída para busca de novos fármacos antitumorais é a pesquisa de metabolitos secundários a partir de plantas medicinais, uma vez que, 1/3 dos medicamentos aplicáveis no tratamento humano são derivados de recursos naturais à base de plantas e mais de 60% são derivados de produtos naturais de uma forma geral (como plantas e micro-

organismos). Essa realidade é verificada também em relação aos antineoplásicos, nos quais os principais compostos derivados de plantas descritos com atividades anticancerígenas e antitumorais são derivados de aldeídos, alcalóides, flavonóides, glicósdeos, terpenoides e compostos de fenol (ALEEBRAHIM-DEHKORDY *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2015; BUYEL, 2018; KARMAHAPATRA *et al.* 2018).

Nesse contexto, há cada vez mais pesquisas com espécies de plantas que seriam capazes de oferecer substâncias anticancerígenas mais efetivas e seguras para o tratamento do câncer. Segundo FORMISIANO e colaboradores (2017), dois compostos isolados do extrato apolar a partir de partes aéreas de *Centaurea drabifolia* (guerina B e cinaropicrina) apresentaram uma potente atividade antitumoral frente às linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda (CRF-CEM) e sua linhagem multi-resistente (CEM/ADR5000). A guerina B apresentou um IC₅₀ de 0,83 uM e 1,26 uM para as linhagens CRF-CEM e CEM/ADR5000 respectivamente, enquanto o composto cinaropicrina, apresentou um IC₅₀ de 0,47 uM e 1,77 uM para as mesmas linhagens respectivamente.

3.4.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também denominada Tripanossomíase Americana, é uma doença tropical negligenciada importante, endêmica em 21 países da América Latina e causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (DANTAS *et al.*, 2018; VILLAMIZAR *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2017). Este protozoário flagelado é mais comumente transmitido aos seres humanos através do contato de fezes infectadas de insetos hematófagos (triatomíneos) com as mucosas do hospedeiro. Além da via vetorial, outros modos de transmissão da doença de chagas também assumiram importância epidemiológica, entre elas, transfusão sanguínea, que conduziu à disseminação da doença para os países em desenvolvimento onde não há ciclo de transmissão, como Espanha, Estados Unidos, Japão e Austrália (DIAS *et al.*, 2016). Recentemente, a ingestão de alimentos contaminados, por fezes de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* contribuiu para a geração de micro-epidemias agudas nas áreas rurais do norte do Brasil (DANTAS *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2017; VARELA *et al.*, 2014). Outras formas de transmissão incluem a transferência vertical de mãe para feto, que representa a terceira via de importância epidemiológica; o transplante de órgãos e tecidos, e acidentes de laboratório (OMS 2018a).

Segundo a OMS (2018 b), a doença de Chagas afeta milhões de pessoas em todo o mundo. E cerca de 60 milhões de indivíduos estão em risco de infecção (VARELA *et al.*, 2014). Na América Latina, estima-se que haja cerca de 12 a 14 milhões de pessoas infectadas pelo parasita (FIOCRUZ, 2017), dos quais a taxa de mortalidade chega a quase 12 mil mortes por ano. (MOLINA-GARZA *et al.*, 2014).

No Brasil há um predomínio dos casos crônicos da Doença de Chagas com estimativa de aproximadamente cinco milhões de indivíduos infectados (VILLAMIZAR *et al.*, 2017) Apesar disso, tem sido verificados casos de fase aguda da doença com ocorrência nos estados da Amazônia legal e, casos isolados, em outros estados associados, principalmente, a surtos familiares por meio da transmissão por via oral do *T. cruzi* relacionados à ingestão de alimentos contaminados (FIOCRUZ, 2013).

Mais de um século após a descoberta da doença de Chagas em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, a população ainda carece de um tratamento efetivo da fase crônica da infecção (VARELA *et al.*, 2014). O atual tratamento da doença de Chagas é limitado a dois medicamentos, o benznidazol (Rochagan®) e o nifurtimox (Lampit®), que foram desenvolvidos há mais de 40 anos (BEZERRA, MENEGUETTI & CAMARGO 2012; MOLINA-GARZA *et al.*, 2014; ROMANHA *et al.*, 2010). Muitas dificuldades são enfrentadas pelos pacientes que fazem uso destes fármacos, uma vez que os mesmos apresentam muitos efeitos colaterais, visto que a dose terapêutica é muito próxima da dose tóxica, e efeitos colaterais graves são relatados durante seu uso clínico, incluindo polineurite, linfadenopatia, dermatite e depressão da medula óssea. Geralmente, devida a estas manifestações, os tratamentos são interrompidos em cerca de 7 a 13% dos casos (VILLAMIZAR *et al.*, 2017). Além disso, estes dois fármacos são eficazes apenas na fase aguda, mas, apesar disso, a OMS recomenda que todo indivíduo infectado com o agente *Trypanosoma cruzi* deve ser submetido à quimioterapia tripanocida, independentemente do estágio de infecção que se encontram (MOLINA-GARZA *et al.*, 2014; BEER, *et al.*, 2016). Geralmente, o tratamento com benznidazol tem aproximadamente 80% de eficácia na fase aguda e 20% na fase crônica da doença (VILLAMIZAR *et al.*, 2017).

Essas limitações associadas ao tratamento da doença de Chagas reforçam a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos. Apesar de inúmeras tentativas e décadas de esforços, o benznidazol ainda não foi substituído por nenhuma molécula ou composto efetivo, seja natural ou sintético, para obter respostas menos tóxicas e mais efetivas aos usuários, uma vez que os fármacos devem ser facilmente

acessíveis (e relativamente baratos) para a população alvo, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados (ROMANHA *et al.*, 2010; VILLAMIZAR *et al.*, 2017).

Os produtos de origem vegetal são hoje, as alternativas mais estudadas contra o *Trypanosoma cruzi* e, a atividade tripanocida de aproximadamente 400 espécies de plantas, pertencentes a mais de 100 famílias, foram analisadas nas últimas duas décadas em busca de um metabólito eficaz frente o parasita (IZUMI *et al.*, 2011).

Alguns autores têm mostrado atividade tripanocida associada a extratos de plantas, por exemplo, MOLINA-GARZA e colaboradores (2014) avaliaram espécies de plantas frente à forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa CL Brener) e verificaram que, os extratos metanólicos das partes aéreas de *Eryngium heterophyllum* apresentou IC₅₀ de 11,24 ug/ml, das cascas de *Haematoxylum brasiletto*, 7,92 ug/ml, das partes aéreas de *Marrubium vulgare*, 22,66 ug/ml, e para as partes aéreas de *Schinus molle* a IC₅₀ foi de 16,31 ug/ml. Estes extratos exibiram níveis de inibição do crescimento de *T. cruzi* entre 88 e 100%.

Em outro estudo, CORDEIRO e colaboradores (2017) testaram as frações de acetato de etila da espécie *Qualea grandiflora* frente à cepa de *Trypanosoma brucei gambiense*, dos quais as frações F1, F5, F6 e F8 mostraram uma atividade significativa, com valores de IC₅₀ de 14,3; 13,9; 8 e 12,2 µg/mL, respectivamente.

Em estudo realizado por BRANQUINHO e colaboradores (2014), foi avaliada a atividade anti-*T. cruzi* *in vivo* de um composto isolado do extrato etanólico das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpha* Spreng., substância denominada licnofolida (LYC). Este metabólito secundário foi avaliado na sua forma livre e também associada a formulações de nanocápsulas (polímeros) em modelo murino experimentalmente infectado com as formas tripomastigotas da cepa CL de *T. cruzi*. Após ter sido realizada a infecção, os camundongos foram tratados na fase aguda com 2,0 mg / kg / dia com a substância livre (LYC), e com dois polímeros para produção da nanocápsula, a LYC-poli-ε-caprolactona (LYC-PCL) e a LYC-ácido poli-lático associado ao polietilenoglicol (LYC-PLA-PEG). Camundongos também foram tratados com 50 mg / kg / dia da solução de benznidazol por via intravenosa. Após 24 h da infecção, os animais foram tratados por 10 dias com as substâncias teste e, avaliados por hemocultura, PCR e ensaio imunoenzimático. Quando tratados com LYC-PCL obteve-se 50% de cura parasitológica; os tratados com o benznidazol tiveram 100% de cura; já a LYC-PLA-PEG obteve 100% de cura apenas quando tratados durante o período de 20 dias, ressaltando, que com 20 dias a formulação de LYC-PCL também apresentou 100% de cura. Esses resultados sugerem que o composto isolado LYC é um potencial novo fármaco para o tratamento da doença de Chagas, principalmente quando associados à nanopartículas.

3.4.3 Leishmanioses

A leishmaniose é uma zoonose causada por cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania*, sendo considerada uma doença tropical negligenciada, e classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma categoria emergente, doença descontrolada, os quais infectam o hospedeiro vertebrado por meio da picada de vetores fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* (Américas) e *Phlebotomus* (África, Europa e Ásia) (MENEGUETTI *et al.*, 2015; GUTIERREZ-REBOLLEDO, DRIER-JONAS & JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; LAINSON *et al.*, 1985).

A leishmaniose apresenta diferentes formas clínicas, dentre as quais, duas categorias amplas, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA).

São endêmicas em 98 países em desenvolvimento, sejam elas regiões tropicais ou subtropicais. Estima-se que a incidência da leishmaniose é de 700 mil a 1 milhão de novos casos no mundo e, que aproximadamente de 20 a 30 mil pessoas morrem por ano por causa da doença. Todos os anos, a incidência é de 50 a 90 mil novos casos para a forma visceral em todo mundo, e de 600 mil a 1 milhão de novos casos ocorrem todo ano para a forma tegumentar (OMS 2018c).

No Brasil, 19 estados são atingidos pela leishmaniose, sendo que mais de 90% dos casos humanos relatados da doença se encontram nas Regiões Norte e Nordeste do país, havendo ainda focos importantes nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste (MONTEIRO *et al.*, 1994), sendo que, a forma mais comum é a leishmaniose cutânea. Contudo, desde 1998 foram relatados casos de leishmaniose viscerais humano e caninos (OLIVEIRA, FALCÃO & BRAZIL 2000). No Brasil as espécies que provocam Leishmaniose Tegumentar Americana em humanos, são basicamente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, a *Leishmania (Viannia) lainsoni*, a *Leishmania (Viannia) shawi*, a *Leishmania (Viannia) naiffi* e a *Leishmania (Viannia) amazonensis* (LAINSON *et al.*, 1979, GONTIJO & CARVALHO, 2003). Em relação à Leishmaniose Visceral, no território brasileiro, a espécie responsável pela infecção é a *Leishmania infantum* e, sua transmissão ocorre, principalmente, pela picada do inseto vetor, *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON *et al.*, 1985).

Mesmo diante da alta incidência de leishmaniose no Brasil e no mundo, existe uma limitação de alternativas para o seu tratamento, uma vez que na ausência de vacinas eficazes,

o único meio de tratar e controlar a leishmaniose é por meio da quimioterapia (MENEGUETTI *et al.*, 2015; TOLEDO *et al.*, 2014).

No tratamento da leishmaniose, os antimoniais pentavalentes (Sb5+) produzidos a mais de 70 anos, são os medicamentos de primeira linha (KIRK & SATI 1947). Contudo, sua alta toxicidade ao usuário leva a efeitos colaterais graves tais como insuficiência renal, pancreatite aguda, mialgia, teratogenicidade, neuropatia periférica, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (arritmia cardíaca), além disso, a longa duração do tratamento e o aparecimento de resistência dos parasitas frente aos fármacos são empecilhos ao tratamento bem-sucedido (GUTIERREZ-REBOLLEDO, DRIER-JONAS & JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017). Os medicamentos de segunda linha, como a anfotericina B e a miltefosina, também apresentam limitações, como toxicidade ao paciente, dificuldade de administração do fármaco e aos altos custos dos medicamentos, dificultam a sua implementação nos sistemas de saúde pública dos países endêmicos (MARANGO *et al.*, 2017; BEER *et al.*, 2016; TOLEDO *et al.*, 2014). Frente ao exposto, a busca por novas substâncias ativas, que possam dar origem a novos medicamentos para o tratamento das Leishmanioses torna-se urgente, considerando os diversos problemas relatados aos fármacos já existentes. Nos últimos anos, tem sido dada uma atenção considerável aos metabolitos secundários das plantas a fim de buscar novas moléculas que podem ser eficazes frente às leishmanioses. Entre estes metabólitos, os terpenos, alcalóides, lignanas e os flavonoides já foram apontados como moléculas promissoras (BEER *et al.*, 2016; MENEGUETTI *et al.*, 2015).

Neste contexto, o uso de plantas como fontes de novas alternativas terapêutica pode ser promissora e alguns estudos tem demonstrado potencial atividade leishmanicida associada a extratos de plantas. Por exemplo, MOREIRA e colaboradores (2017), ao avaliarem a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Vernonia polyanthes* e da substância dele isolada (Zerumbone) verificaram significativa atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania infantum*, com redução considerável da viabilidade dos parasitas. O óleo essencial de *Vernonia polyanthes* apresentou uma IC₅₀ de 19,4 µg/ml, e o constituinte que foi isolado obteve um IC₅₀ de 9,0 µg/ml frente os parasitos.

Em outro estudo realizado com extratos da planta *Echium arenarium* (Guss), KEFI e colaboradores (2018) observaram que o extrato de acetato de etila exibiu elevada atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania*, apresentando IC₅₀ de 9,91 ± 0,15 µg / mL contra a espécie *L. infantum*, causadora da forma visceral e 13,91 ± 0,43 µg / mL contra a espécie *L. major*, causadora da forma cutânea. Com redução do crescimento dos parasitas em mais de 90%. Em outro estudo, realizado por TOLEDO e colaboradores (2014)

foi demonstrado que sete de oito compostos isolados de *Tithonia diversifolia* apresentaram atividade leishmanicida considerável frente às formas promastigotas da cepa H-3227 de *Leishmania braziliensis*. Os compostos tagitinina C; 1 β ,2 α -epoxitagitinina C; e tagitinina F apresentaram menores DL₅₀, com 3,2; 2,2 e 7,4 μ g/mL respectivamente, sendo que o composto 1 β ,2 α -epoxitagitinina C e tagitinina F apresentaram índice de seletividades consideráveis: >22,7 e >6,7 respectivamente.

3.4.4 Infecções Bacterianas

Os fármacos usados na terapia antibacteriana revolucionaram a medicina e nossa capacidade de controle sobre as infecções bacterianas, por promoverem uma extraordinária diminuição na morbidade e mortalidade causada por infecções microbianas (JACKSON, CZAPLEWSKI & PIDDOCK, 2018).

Quando se faz necessário o uso de antibióticos, os mesmos deveriam ser prescritos de forma racional, com base em um diagnóstico concreto e não baseado apenas em dados epidemiológicos de determinados agentes etiológicos, uma vez que seu uso irracional pode favorecer o aparecimento de patógenos resistentes, principalmente em ambientes hospitalares, tornando-se um problema sério no tratamento das doenças infecciosas (KADOSAKI *et al.*, 2012). Além disso, a prática irracional no uso da antibioticoterapia, como usuários que não seguem a posologia correta, também têm contribuído para o surgimento de resistência bacteriana (FIOL *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno ecológico e natural, que ocorre como consequência da habilidade da população bacteriana de se adaptar frente ao amplo uso de antibióticos (SANTOS 2004). Vários mecanismos podem levar as bactérias a apresentarem resistências a antibióticos, por exemplo: (1) a modificação de alvos protéicos para antibióticos; (2) a produção de enzimas que podem degradar ou modificar a estrutura do antibiótico tornando-o ineficaz no tratamento de infecções; (3) as alterações da permeabilidade da parede celular devido a mutações, dificultando a ação do fármaco; (4) o uso do sistema de bombeamento para expulsar as moléculas de antibióticos para fora das células bacterianas (ALDULAIMI *et al.*, 2017). Consequentemente, o uso de antibióticos, principalmente de forma irracional, pode culminar em forte pressão seletiva sobre os microrganismos, cada vez mais resistentes (JACKSON, CZAPLEWSKI & PIDDOCK, 2018). Geralmente, os fatores que favorecem seu aparecimento estão relacionados à utilização

inadequada do fármaco, com frequente exposição, uso de subdoses e por tempo de tratamento inadequado (GUIMARÃES *et al.*, 2010a).

A resistência dos patógenos aos tratamentos com os antimicrobianos representa uma crescente ameaça para a saúde pública, afetando tanto países desenvolvidos como em desenvolvimento, sendo, portanto, um problema emergente, uma vez que compromete a atividade farmacológica e a eficácia das drogas antibacterianas disponíveis e, conseqüentemente, coloca em risco a saúde da população (NICHOL *et al.*, 2015; ABUELIZZ *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2004).

Segundo RAMOS-CASTAÑEDA e colaboradores (2018), cerca de 10 a 50% das infecções que ocorrem na América Latina, são oriundas de resistências associadas a antibióticos. Nos Estados Unidos e Europa, morrem cerca de 50 mil pessoas decorrentes de resistência bacteriana e, a nível mundial, estima-se que possa ser superior a 700.000 mortes por ano. Até o ano de 2050, estima-se que 10 milhões de pessoas poderiam vir a óbito como conseqüência direta da multiresistência a micro-organismos.

No Brasil, estima-se que a taxa de infecções hospitalares atinja cerca de 14% das internações nosocomiais. Segundo dados da ANVISA, aproximadamente 234 milhões de pacientes são operados por ano em todo o mundo, e destes, um milhão morre em decorrência de infecções hospitalares, e sete milhões ainda apresentam complicações no pós-operatório (ANVISA 2015).

Muitos centros de saúde e hospitais têm registrado altas taxas de infecções nosocomiais, sendo elas causadas por bactérias resistentes, como *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina ou bactérias Gram-negativas, que apresentam resistência a vários medicamentos (IGWARAN *et al.*, 2017; NGEZAHAYO *et al.*, 2017), como a *Escherichia coli*, que já apresentou resistência a cefalosporionas e aminoglicosídeos (BAPTISTA 2013).

Desta forma, é evidente a necessidade de encontrar novas maneiras de prevenir a resistência microbiana e/ou descobrir novos antibióticos, ou ainda melhorar os existentes (NICHOL *et al.*, 2015), uma vez que, cada vez mais casos de resistência estão surgindo, aumentando os riscos para os pacientes, além do aumento com os custos econômicos que são gastos com os pacientes (OBOLSKI, STEIN & HADANY, 2015).

Entretanto, é necessário considerar a dificuldade de identificar novas estruturas com novos mecanismos de ação em microrganismos, devido ao alto custo relacionado ao desenvolvimento de novos fármacos. Esta realidade tem provocado um declínio no lançamento de novas drogas no mercado (DEMAIN, 1999; JACKSON, CZAPLEWSKI &

PIDDOCK, 2018), representando um problema para a população que carece de antimicrobianos mais eficazes, em vista ao desenvolvimento de microrganismos resistentes a aos fármacos já existentes.

No quadro 1 estão descritas as bactérias que serão utilizadas nos ensaios, representadas as suas principais características, os antibióticos mais efetivos, as resistências associadas a antibióticos, e suas características farmacológicas.

Quadro 1: Características das bactérias utilizadas neste estudo e fármacos disponíveis para o tratamento das infecções bacterianas, resistências associadas, e suas características farmacológicas.

Bactéria	Classificação pelo Gram	Patologia causada no homem	Antibiótico efetivo	Classe	Mecanismo de Ação	Resistência	Referências
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativa	Infecções do trato urinário e gastrointestinais	Amoxicilina, Penicilina	β -Lactâmicos	Inibidor da síntese da parede celular	Cefalosporina, Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas	Baptista (2013); Franco (2002)
			Polimixina E	Polimixinas	Inibição da síntese da membrana citoplasmática		
			Ciprofloxacina, Norfloxacina e Ofloxacina	Fluoroquinolona	Alteração na síntese dos ácidos nucleicos		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Gram-negativa	Infecção neonatal	Estreptomicina, Gentamicina, Canamicina e Amicacina	Aminoglicosídeos	Inibição da síntese proteica nos ribossomos	Sulfazotrin, penicilinas, Sulfazotrin, Penicilinas,	Ministério da Saúde (2010); Costa, <i>et al.</i> , (2010); Baptista (2013); Reiss <i>et al.</i> , (2000)
			Polimixina E	Polimixinas	Inibição da síntese da membrana citoplasmática	Cefalosporinas e Aztreonam.	

Bactéria	Classificação pelo Gram	Patologia causada no homem	Antibiótico efetivo	Classe	Mecanismo de Ação	Resistência	Referências
<i>Proteus mirabilis</i>	Gram-negativa	Infecções no trato respiratório, urinário, gastrointestinais	Amoxicilina, Penicilina	β-Lactâmicos	Inibidor da síntese da parede celular	Cefalosporina, Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas	Baptista (2013); Michelim (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negativa	Infecção nosocomial relacionadas ao trato urinário, respiratório, da pele, e tecidos moles	Penicilinas, antipseudomonas	β-Lactâmicos	Inibidor da síntese da parede celular	Sulfonamida, trimetoprim, tetraciclina, cloranfenicol e Macrolídeos	Baptista (2013); Neves <i>et al.</i> , (2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positiva	Desde simples infecções até mais graves como pneumonia e meningite	Estreptomicina, Gentamicina, Canamicina e Amicacina	Aminoglicosídeos	Inibição da síntese proteica nos ribossomos	Meticilina, Rifampicina.	Baptista (2013); Rodrigues <i>et al.</i> , (2017)

Bactéria	Classificação pelo Gram	Patologia causada no homem	Antibiótico efetivo	Classe	Mecanismo de Ação	Resistência	Referências
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Gram-negativa	Gastrenterites e intoxicações alimentares	Cloranfenicol	Anfenicóis	Inibição da síntese proteica nos ribossomos	Quinolonas	Baptista (2013); Balbani & Butugan, (2001); Borowsky <i>et al.</i> , (2006)
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-positiva	Intoxicações alimentares	Ciprofloxacina, Norfloxacina e Ofloxacina	Fluoroquinolona	Alteração na síntese dos ácidos nucléicos	Vancomicina	Lago (2002); Gomes (2013); Soares <i>et al.</i> , (2008)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram-positiva	Listeriose, meningite, encefalite, infecções cervical e/ou intra-uterina	Penicilina G e V, Ampicilina	β -Lactâmicos	Inibidores da síntese da parede celular	Cefalosporinas, tetraciclina	Barancelli <i>et al.</i> , (2011); Barocci <i>et al.</i> , (2015); Silva (2009); Baptista (2013)
			Cloranfenicol	Anfenicóis	Inibição da síntese proteica nos ribossomos		
			Eritromicina	Macrolídeos	Inibição da síntese proteica		

Diante do exposto e considerando que a resistência bacteriana é um grave problema de saúde pública (MENEZES *et al.*, 2007; SANTOS, 2004; OLIVEIRA & SILVA, 2008), uma vez que cepas resistentes de bactérias já são relatados, além da falta de novos fármacos efetivos (SANTOS *et al.*, 2004), se faz necessário a busca de novos compostos antimicrobianos que proporcionem um tratamento mais eficaz, sendo a triagem a partir de substâncias extraídas de plantas uma promissora estratégia (LORENZONI, *et al* 2013; PENNA *et al.*, 2001).

Corroborando tal observação, vários trabalhos têm apresentado resultados favoráveis ao avaliarem a atividade antibacteriana de produtos naturais. HAFIZ e colaboradores (2018) avaliaram o potencial antibacteriano de extratos da planta *Thymus vulgaris* e, foi observado que a fração metanólica mostrou atividade significativa contra *Bacillus subtilis*.

Em outro estudo, JARADAT & AL-LAHHAM (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana da fração metanólica da espécie *Scolymus angiospermus*, em que foi observada atividade significativa frente às bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, com CIM de 1,75; 6,25; 12,5 mg/mL respectivamente, e frente aos fungos *C. albicans* e *E. floccosum*, com CIM de, 17,5 e 25 mg/ml, respectivamente.

A busca de novas substâncias com potenciais antibacterianos a partir de plantas medicinais é extremamente abundante, contudo, na avaliação de resultados promissores sobre qual a concentração aceitável, ainda não existe um consenso na literatura quanto à concordância da concentração que pode ser considerada com potencial efeito, quando comparada com antibióticos convencionais (DUARTE, 2006). Para alguns autores, resultados promissores de extratos vegetais são aqueles em que os resultados se apresentam similares aos de antibióticos conhecidos, e ainda, se o pesquisador trabalhar com uma fração já determinada ou substância pura (ALIGIANIS *et a.*, 2001).

Diversos estudos adotam faixas de CIM para extratos vegetais, de forma que possam ser classificados quanto à atividade inibitória frente às cepas bacterianas e não há consenso na literatura sob a faixa adotar, conforme descrito na tabela 3. MITSCHER *et al.*, (1972) relata que, dificilmente uma substância pura que não apresente atividade até 10 µg/mL seria um bom candidato a uso clínico, contudo, a aplicação desta observação frente a frações e principalmente a extratos brutos pode ser complicada, devido ao fato de o extrato bruto e até mesmo as frações serem geralmente uma mistura complexa de substâncias, sendo que muitas podem estar presentes em baixas concentrações ou agirem sinergicamente, ou mesmo antagonicamente.

Tabela 3: Classificação da Concentração inibitória Mínima (CIM) para extratos, frações e substância pura de vegetais quanto à atividade antibacteriana.

Extrato, fração ou substância pura	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			Referências
	Atividade leve	Atividade moderada	Atividade alta	
Extrato bruto	500 – 1000	100 – 500	< 100	SARTORI (2005); FABRY <i>et al.</i> , (1998); HOLETZ <i>et al.</i> , (2002); DALL’AGNOL <i>et al.</i> , (2003); SIMONETTI <i>et al.</i> , (2016).
Extrato bruto	250 – 500	101 – 250	< 100	ARAÚJO <i>et al.</i> , (2010).
Extrato bruto	≥ 1600	201 – 510	200	SANTURIO <i>et al.</i> , (2007).
Extrato bruto	> 500 e ≤ 1000	>100 e ≤ 500	≤ 100	SANTOS <i>et al.</i> , (2015a); AYRES <i>et al.</i> , (2008).
Extrato bruto, frações e substância pura.	150 – 250	75 – 150	< 75	MARQUI <i>et al.</i> , (2008).
Extrato bruto e frações.	_____	_____	≤ 100	RÍOS & RECIO (2005); GIBBONS (2008).
Substância pura	_____	_____	≤ 10	RÍOS & RECIO (2005); GIBBONS (2008).

_____ Não demonstrada pelo autor.

3.4.5 Infecções Fúngicas

Os fungos são pertencentes ao reino *Fungi*, são seres eucarióticos, heterotróficos e apresentam-se em três grupos: as leveduras (seres unicelulares), os fungos filamentosos (seres multicelulares) e os cogumelos, sendo os dois primeiros microscópicos e responsáveis por causar problemas de micoses em humanos e o último macroscópico (ALMEIDA *et al.*, 2015; LEVINSON, 2016). Os fungos podem causar infecções nos seres humanos, sendo que, na maioria das vezes, as infecções ocorrem na pele e sem grandes extensões. Contudo, relacionado ao ambiente hospitalar, as infecções fúngicas passaram a ter uma grande importância nos últimos anos, em que, algumas espécies em condições de debilidade do sistema imune do indivíduo são capazes de provocar infecções sistêmicas mais graves, que podem até mesmo levar à morte. Tais infecções, associada a um quadro de imunossupressão do paciente, pode provocar altas taxas de morbidade e mortalidade (NORDOY *et al.*, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2015; NAKAMURA *et al.*, 2013; SILVA, 2010).

Nos últimos 30 anos, as infecções fúngicas estão se tornando cada vez mais comuns, e com isso, se tornam um relevante problema de saúde pública, principalmente quando surgem casos de resistência microbiana (ANDRADE *et al.*, 2017). Tais infecções, além do risco à saúde do paciente, também trazem consequências econômicas, uma vez que tratamentos mais dispendiosos são necessários (KEMAYKIN *et al.*, 2018). Segundo LAZZARINI e colaboradores (2018), recentemente foi estimado que mais de 300 milhões de indivíduos são diagnosticados em todo mundo com infecções fúngicas graves, dos quais os patógenos responsáveis pelas infecções são principalmente dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis*.

Os fungos leveduriformes (quadro 2), foco da nossa atividade antifúngica, são muito frequentes nas infecções hospitalares (ANVISA 2018), dentre eles, o gênero *Candida*, bastante conhecido e responsável por causar infecções como candidíase ou candidose, suas lesões podem ser branda, aguda ou crônica, apresentando-se ainda como superficial ou profunda. Seu espectro clínico pode variar conforme o estado imunitário do paciente (FREIRE *et al.*, 2016), podendo causar uma ampla gama de efeitos adversos para a saúde humana (SCHRODER *et al.*, 2018). Estima-se que existam cerca de 150 espécies dentro do gênero *Candida* (DIGNANI *et al.*, 2003). Contudo, apenas algumas cepas estão relacionadas com infecções humanas, as quais estão incluídas, principalmente, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida famata* (FEYAERTS *et al.*, 2018;

GOMÉZ *et al.*, 2010). As micoses causadas por leveduras deste gênero são de extrema importância clínica e estão entre aquelas que apresentam maior incidência. As espécies deste gênero são microrganismos comensais, presentes na microbiota de pessoas híginas, e são os principais responsáveis por causarem doenças oportunistas nas pessoas (ANDRADE *et al.*, 2017; VIDIGAL & SVIDZINSKI., 2009).

Além das espécies do gênero *Candida*, leveduras do gênero *Cryptococcus* também são relatadas por causarem doenças oportunista nos humanos, uma vez que são frequentemente encontradas na prática clínica (NAIR, JERALD J. & STADEN, JOHANNES VAN, 2018). Uma das manifestações clínicas mais graves causadas pelo gênero *Cryptococcus* é a meningite criptocócica, que acomete o SNC, e que muitas vezes esta associada a pacientes HIV positivos (SCHWARTZ *et al.*, 2018). O CDC (Centros de Controle e Prevenção de Doenças) estima que globalmente, haverá uma incidência de mais de 1 milhão de novos casos de criptococose por ano, principalmente em pacientes com AIDS, dos quais 600.000 poderão vir a morrer por causa da infecção (LAZZARINI *et al.*, 2018).

As principais classes de fármacos antifúngicos utilizados na clínica médica incluem: os imidazólicos (como o fluconazol, cetoconazol, itraconazol, etc.), os polienos (como a anfotericina B), as equinocandinas (como a caspofungina), entre outros. Tais antifúngicos, como muitos medicamentos, apresentam limitações, como nefrotoxicidade, interações medicamentosas, estreito espectro de atividade e surgimento de cepas resistentes. Por estas razões, se faz necessária a busca de novas drogas antifúngicas, visando diferentes atividades e com menos efeitos colaterais (LAZZARINI *et al.*, 2018). Assim, a busca contínua por novos agentes antimicrobianos é de extrema importância no campo medicinal, seja descobrindo novas moléculas ativas, seja otimizando moléculas de antimicrobianos já conhecidos (KOTB *et al.*, 2017).

Muitos fármacos provenientes ou derivados de produtos naturais já são utilizados no tratamento de infecções microbianas, um grande exemplo é a penicilina, descoberta acidentalmente por Fleming em 1928 (CHAPLA, BIASETTO & ARAUJO 2013), que é utilizada até hoje no tratamento destas infecções. Outras classes de fármacos como os polienos, macrólidos e equinocandinas também são oriundos ou derivados de produtos naturais e também são utilizadas na terapia clínica (FEYAERTS, *et al.*, 2018).

No quadro 2, estão descritas algumas espécies de fungos leveduriformes de interesse médico e, que serão utilizadas nos ensaios, representando suas principais características, os antibióticos mais efetivos, as resistências associadas a antibióticos, e suas características farmacológicas.

Quadro 2: Características dos fungos (leveduriformes) utilizados neste estudo e fármacos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, resistências associadas, e suas características farmacológicas.

Fungos (Leveduras)	Patologia causada no homem	Antibiótico efetivo	Classe	Mecanismo de Ação	Resistência	Referências
<i>Candida albicans</i>	Candidíase oral e genital, candidemia e infecções sistêmicas fatais (imunocomprometidos)	Anfotericina B	Antifúngico Poliênico	Interage e altera a membrana celular do fungo	Azólicos, como fluconazol	Melo, Duarte & Soares (2012); Quintero (2010)
		Caspofungina	Equinocandinas	Interage com a parede celular dos fungos e com as enzimas		
		Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol	Imidazólicos	Interage com a membrana celular dos fungos/inibe a síntese de esteroides		
<i>Candida krusei</i>	Fungemia disseminada (imunocomprometidos); artrite	Voriconazol	Imidazólico	Altera a membrana celular (ergosterol) alterando sua permeabilidade	Sulfazotrin, penicilinas,	Singh <i>et al.</i> (2002); Samaranayake, (1994)
	Endocardite e vulvovaginite recorrente em mulheres	Anfotericina B	Antifúngico Poliênico	Interage e altera a membrana celular do fungo	Azólicos, como fluconazol	Melo, Duarte & Soares (2012);

Fungos (Leveduras)	Patologia causada no homem	Antibiótico efetivo	Classe	Mecanismo de Ação	Resistência	Referências
<i>Candida tropicalis</i>	Candidemia, principalmente em idosos com doenças malignas hematológicas, problemas respiratórios crônicos e pacientes neutropênicos	Caspofungina	Equinocandinas	Interage com a parede celular dos fungos e com as enzimas	Sulfazotrin, icilinas, flucitosina e aos azóis, como o fluconazol	Melo, Duarte & Soares (2012); Chong <i>et al.</i> , (2012); Law, <i>et al.</i> , (1996); Vandeputte <i>et al.</i> , (2005); Menezes <i>et al.</i> , (2009); Kothavade <i>et al.</i> , (2010); Fernandéz-Ruiz, <i>et al.</i> , (2015)
		Anfotericina B	Antifúngico Poliênico	Interage e altera a membrana celular do fungo		

Diante disso, produtos naturais como as ervas medicinais podem representar fontes importantes na descoberta de novos fármacos antifúngicos (NAIR, JERALD J. & STADEN, JOHANNES VAN, 2018; QIN *et al.*, 2018; ESSID *et al.*, 2017; FENNER *et al.*, 2006; RUIZ-CAMPS & CUENCAESTRELLA, 2009).

Na busca de novas moléculas com ação antifúngica, diversos estudos adotam diferentes faixas de CIM quando extratos vegetais são avaliados, de forma que possam ser classificados quanto à atividade inibitória frente às cepas fúngicas.

Isto posto, não há critérios para classificação da atividade exercida por produtos naturais quanto à concentração que pode ser considerada com efeito antifúngico promissor, sendo adotados valores distintos dependendo do estudo, conforme descrito na tabela 4.

Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
Extrato, fração ou substância pura	Atividade leve	Atividade moderada	Atividade alta	Referências
Extrato bruto	501 – 1000	101 – 500	< 100	MENEZES <i>et al.</i> , (2009).
Extrato bruto	—	—	< 125	ALBERNAZ <i>et al.</i> , (2010); ASSIS (2013).
Extrato bruto	500 – 1000	100 – 500	< 100	HOLETZ <i>et al.</i> , (2002).
Extrato bruto	> 1600	600 – 1500	≤ 500	DUARTE <i>et al.</i> , (2005); ALIGIANNS <i>et al.</i> , (2001).
Extrato bruto e frações.	500 – 1000	100 – 500	< 100	AYRES <i>et al.</i> , (2008); REGASINI <i>et al.</i> , (2010).
— Não demonstrada pelo autor.				

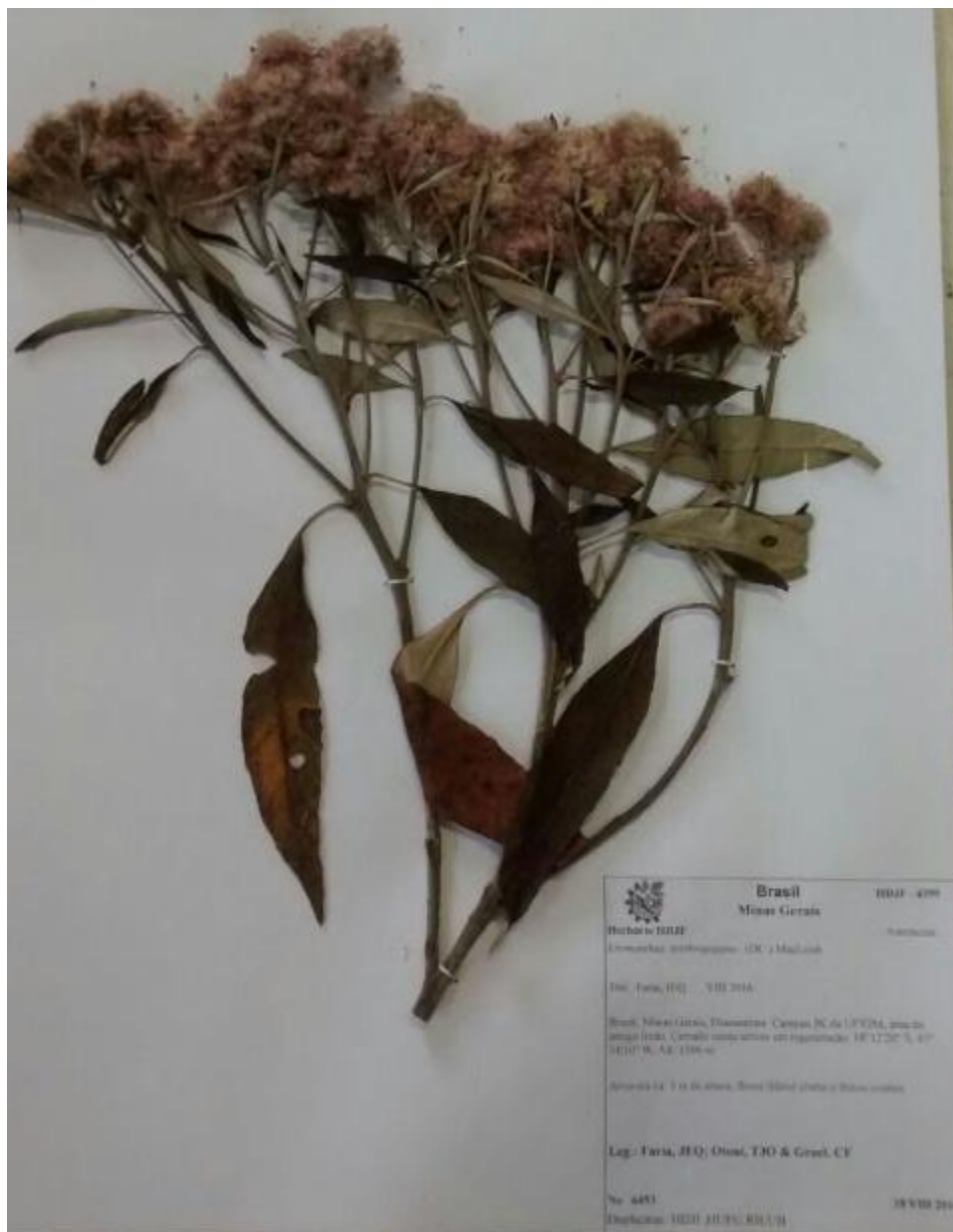
4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

4.1.1 Coleta e identificação taxonômica

As partes aéreas (folhas e flores) da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish, pertencente à família Asteraceae, foram coletadas na cidade de Diamantina, Minas Gerais, no campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri no mês de Janeiro de 2017. O material coletado foi georreferenciado, localizado nas coordenadas geográficas 18° 12'20" S de latitude e 43° 34'10" W de longitude a 1396 m de altitude. E o *voucher* foi depositado no Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri sob o número de registro HDJF4599. Na figura 3 está a imagem referente à exsicata da espécie utilizada no estudo.

Figura 3: Exsicata *Eremanthus Erythropappus* (DC.) McLeish



A espécie não consta na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014). A autorização de acesso ao patrimônio genético desta espécie, para fins de pesquisa científica se encontra na Figura 1 do Anexo A, sobre número do cadastro: AACD7CF.

4.1.2 Preparo do extrato etanólico bruto

O material vegetal (folhas e flores) foi dessecado em estufa de ar circulante (Biopar®, modelo S480AT) a 40° C. O material foi, posteriormente, pulverizado com auxílio de moinho de facas (Marconi®, modelo MA580). Após os procedimentos de secagem e pulverização, foram obtidos 565,9 gramas de pó de *E. erythropappus*.

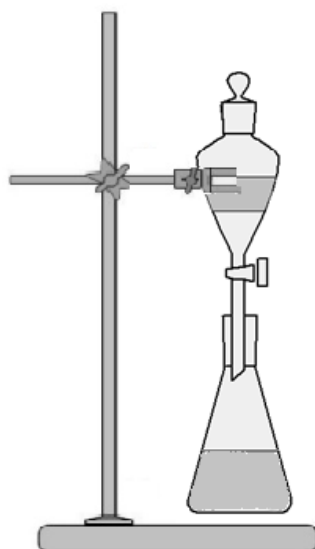
O pó obtido foi adicionado em frascos âmbar de 1 litro e submetidos à extração por maceração exaustiva por aproximadamente 10 dias a temperatura ambiente, utilizando-se como solvente extrator etanol 96% na razão 1:10 p/v (planta:solvente), solvente este que também foi utilizado no preparo do extrato bruto no estudo prévio realizado pelo nosso grupo. O extrato etanólico obtido foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo (Fisaton®, modelo 801) e transferido para pequenos frascos âmbar previamente tarados, promovendo-se a secagem final a temperatura ambiente em dessecador contendo sílica higroscópica e, sob vácuo.

4.2 Fracionamento do extrato etanólico bruto através de partição líquido-líquido

Uma alíquota do extrato etanólico bruto seco das partes aéreas de *E. erythropappus* foi fracionada através de partições líquido/líquido (figura 4) com solventes em polaridade crescente (hexano – diclorometano – metanol) e a caracterização das frações foi feita por diferentes metodologias, conforme sumariado no delineamento experimental (Figura 5). Após a suspensão do extrato bruto em solução metanol: água (3:1) foram utilizados dois solventes orgânicos para as partições: hexano e diclorometano, obtendo-se as respectivas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcólica (Metanol/Água).

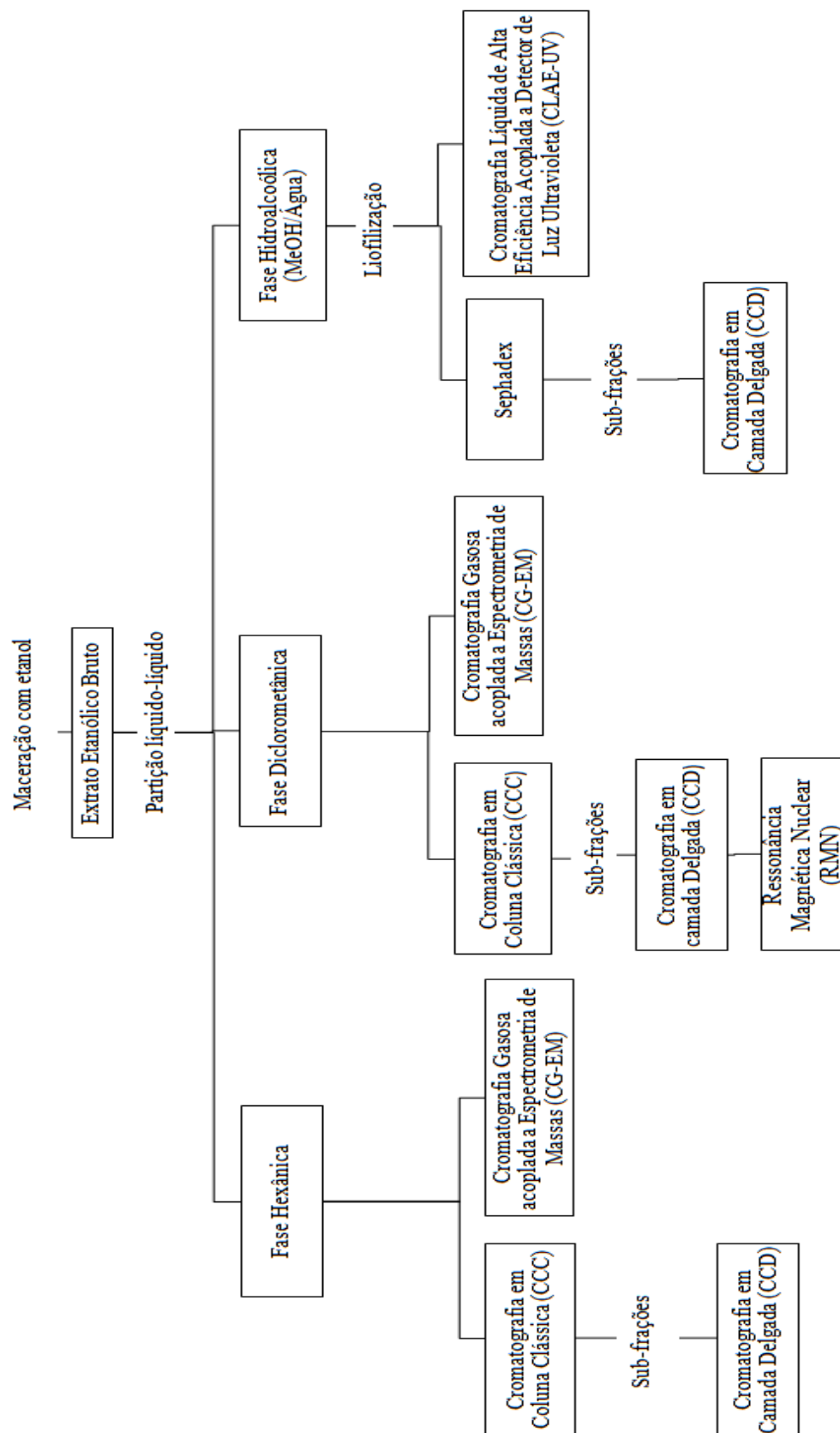
As frações hexânica, diclorometânica e hidroalcólica foram concentradas em evaporador rotativo e transferidas para frascos âmbar previamente tarados, para secagem final a temperatura ambiente em dessecador sob vácuo, com sílica higroscópica. A fração aquosa remanescente foi liofilizada em Liofilizador (Labconco®).

Figura 4: Sistema do aparato de partição líquido-líquido



Na Figura 5 está representado o delineamento das principais análises fitoquímicas a que o extrato etanólico bruto e frações das partes áreas da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) foram submetidas.

Figura 5: Delineamento das principais análises químicas a que o extrato e frações das partes áreas da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish foram submetidas.



4.3 Processos Cromatográficos

4.3.1 Cromatografia em Coluna

Para obtenção das sub-frações a partir das frações hexânica e diclorometânica resultantes da partição líquido-líquido, foi aplicada a cromatografia em coluna (50 cm x 17 cm). Foi utilizada como fase estacionária a SILICAGEL 60 tamanho 0,05 – 0,2 mm (Dinâmica®). Como fase móvel utilizou-se os solventes hexano, acetato de etila e etanol, e misturas dos mesmos, em gradientes crescentes de polaridade (conforme a tabela 5) (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Tabela 5: Fase móvel em polaridade crescente utilizada na cromatografia em coluna para separação cromatográfica da fase hexânica e da fase diclorometânica do extrato etanólico de partes aéreas de *Eremanthus Erythropappus* (DC) McLeish.

SOLVENTES	PROPORÇÃO	VOLUME (mL)
Hexano	100%	75
Hexano/Acetato de Etila	8:2	60/15
Hexano/Acetato de Etila	6:4	45/30
Hexano/Acetato de Etila	4:6	30/45
Hexano/Acetato de Etila	2:8	15/60
Acetato de Etila	100%	75
Acetato de Etila/Etanol	8:2	60/15
Acetato de Etila/Etanol	6:4	45/30
Acetato de Etila/Etanol	4:6	30/45
Acetato de Etila/Etanol	2:8	15/60
Etanol	100%	75

4.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Após a realização da Cromatografia em Coluna das fases hexânica e diclorometânica, com obtenção das subfrações, estas foram submetidas à CCD, empregando placas de Sílica Gel₂₅₄, 20 x 20 cm, espessura 250 µm (Whatman®). Como agentes reveladores foram usadas luz UV ($\lambda = 254$ e 366 nm) (lâmpadas Sankyo Denk ®) e vanilina sulfúrica (seguida de aquecimento da placa a 100 - 110°C), a fim de reunir as frações que apresentaram semelhanças na análise cromatográfica.

4.3.3 Cromatografia de Exclusão (Sephadex)

A fase hidroalcoólica final foi rotaevaporada e obteve-se então a fase aquosa remanescente, que foi congelada e, posteriormente, liofilizada. Para o fracionamento da fase aquosa remanescente, foi realizada a cromatografia de exclusão, com uso de gel de dextrana (Sephadex LH-20™), utilizando-se como fase móvel metanol PA.

4.3.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

As análises de CG/EM foram realizadas no Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas (CG/EM), marca Perkin Elmer®, coluna DB-5-MS Agilent® (30m x 0,25 mm, 0,25 µm), do Laboratório de Pesquisas e Pós-Graduação (LPP) – do Departamento de Química - UFVJM. As frações hexânica e diclometância foram dissolvidas em metanol grau HPLC e foram injetadas no equipamento, com gás de arraste hélio, pressão de 81,5 kPa e fluxo de 1,2 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram 260°C e 300°C, respectivamente. Na análise foi utilizado um gradiente: 60 °C por 2 min, 60-120°C (30°C/min), 120-220°C (10°C/min), 220-300 °C (5°C/min), 300 °C por 20 min. O tempo total da análise cromatográfica foi 50 minutos (BRACHET *et al.*, 1997; ZUANAZZI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Foi empregado potencial de fluxo de 70 eV.

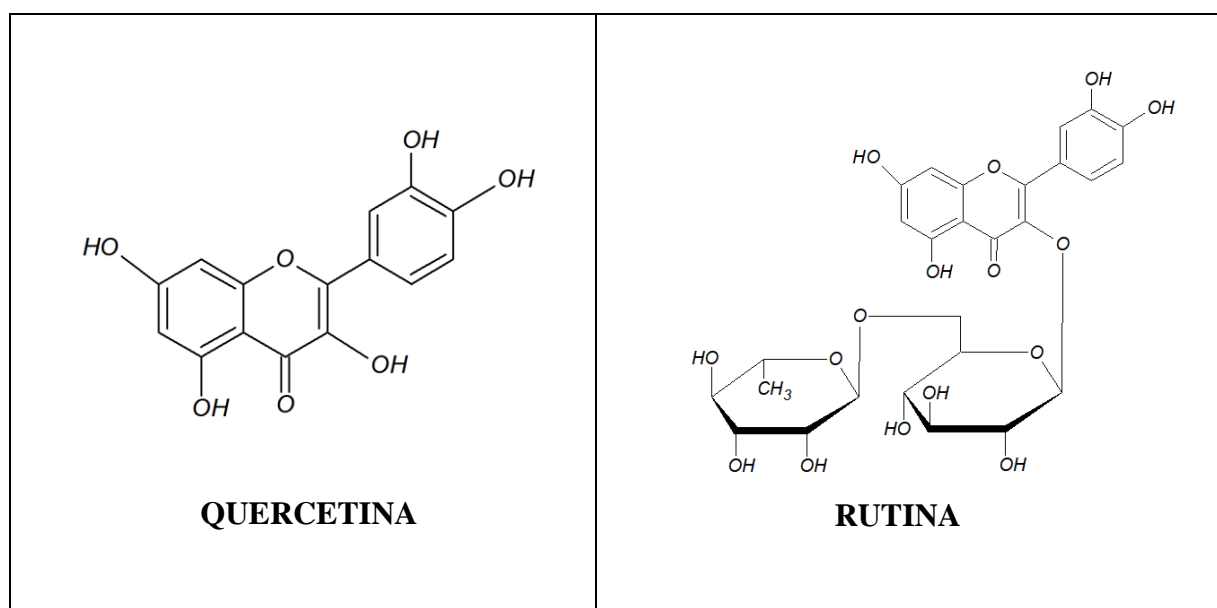
4.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector Ultravioleta (CLAE-UV)

A fração hidroalcoólica obtida da partição líquido-líquido foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Luz Ultravioleta ProStar e degaseificador Degassit 6341, localizado no Laboratório de Pesquisas e Pós-Graduação (LPP) – do Departamento de Química - UFVJM. A análise foi realizada em coluna analítica de fase reversa Supelcosil TM LC-18 (25 cm x 4,6 mm) com filme de revestimento de 5 µm de espessura. Sistema equipado com pré-coluna Varian C18, com colaboração do Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly (Departamento de Química- FACET-UFVJM).

A identificação de compostos a partir da CLAE-UV foi proposta pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos no cromatograma da amostra hidroalcoólica frente ao cromatograma de dois padrões utilizados.

Os padrões cromatográficos utilizados foram a quercetina e a rutina (Biotec®) (figura 6), compostos pertencentes à classe dos flavonóides e, comumente encontrados em espécies do gênero *Eremanthus*.

Figura 6: Estrutura química da Quercetina e da Rutina.



Para o preparo da amostra, pesou-se 100 mg da fração hidroalcoólica e, a mesma foi dissolvida em 1 mL de água mili-Q e em 1 mL de acetonitrila (ACN) (solventes utilizados na fase móvel), obtendo uma concentração final de 50mg/mL, posteriormente a amostra foi filtrada em seringa de filtração 0,22 µm (Nylon) e o volume injetado no equipamento foi de 20 µL.

Os padrões quercetina e rutina foram preparados nas concentrações de 2,5 e 10 mg/mL respectivamente, uma vez que a quercetina, devido à baixa solubilidade em água mili-Q e ACN 1:1, a mesma foi preparada na concentração de 2,5 mg/mL, sendo as mesmas dissolvidas e analisadas nas mesmas condições da amostra, conforme demonstrado abaixo.

Toda fase móvel utilizada foi de grau HPLC, e os solventes para eluição foram: A = ácido acético aquoso, 2% (v / v); solvente B = ACN - 98%; ácido acético - 2% (v / v); a um fluxo de 1,6 mL/min (GOUVEA *et al.*, 2012).

O gradiente de eluição da fase móvel e suas proporções estão descritos na tabela 6. O cromatograma da CLAE-UV foi registrado a 325 nm.

Tabela 6: Gradiente de eluição da fase móvel utilizada na análise em CLAE-UV da fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
35	82	18
40	77	23
50	72	28
60	60	40
65	0	100

Solvente A: Ácido acético aquoso, 2%.

Solvente B: = ACN - 98%; ácido acético - 2%.

Fluxo: 1,6 mL/min.

4.4 Ensaios biológicos

Os ensaios para avaliação das atividades antitumoral, leishmanicida, tripanocida, antibacteriana, antifúngica e de citotoxicidade foram realizados nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Farmácia e no laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do CIPq-Saúde, da UFVJM .

O extrato bruto etanólico e suas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica foram dissolvidas em DMSO, solvente orgânico, na concentração de 0,125%, como previamente padronizado por OLIVEIRA (2016). Posteriormente, foram submetidos a banho de ultrassom (Unique®) por duas horas e armazenados a -20°C até o momento do uso. Os fármacos padrões foram também avaliados quanto à citotoxicidade, empregando as células L929.

4.4.1 Avaliação da Atividade antitumoral

4.4.1.1 Linhagem Celular e Manutenção

Para a avaliação da atividade antitumoral foram utilizadas duas linhagens de células tumorais, a MDA-MB-231 (ATCC[®] HTB-26TM), e a A549 (ATCC[®], CCL-185). A linhagem MDA-MB-231 é uma linhagem celular de adenocarcinoma de câncer de mama, enquanto a linhagem A549 é uma linhagem de adenocarcinoma alveolar humano.

Por representarem bons modelos de células cancerígenas de mamíferos, estas foram utilizadas no presente trabalho (KHAN *et al.*, 2018). Para triagem inicial das atividades antitumorais do extrato bruto e suas frações, as células MDA-MB-231 foram submetidas à expansão celular em garrafas de cultura de 75 cm² de área, empregando meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM (Sigma[®]), contendo 10% de soro fetal bovino, 1,6% de L-glutamina 200 mM e 1% de uma solução estabilizada de penicilina (10.000 U/mL)/estreptomicina (10 µg/mL). Posteriormente, as células foram submetidas à incubação em estufa a 37°C e, atmosfera de 5% de CO₂ e o crescimento celular foi acompanhado diariamente ao microscópio invertido (Meddilux, modelo MDL 150 TAI), onde foi feita a troca de meio até obtenção de 80% de confluência. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS 1X e, foi adicionado 1 mL de solução 0,5% de tripsina-EDTA para promover a dispersão da monocamada de células e a garrafa foi deixada em repouso por aproximadamente três minutos. Após este período, a tripsina foi inativada com 9 mL do meio DMEM Sigma[®] suplementado.

As células da linhagem A549 foram submetidas a cultivo e manutenção nas mesmas condições descritas para a linhagem MDA-MB-231, mas utilizando o meio *Modified Eagle's Medium* MEM Cultilab[®], devidamente suplementado com 10% de SFB, 3% de solução de 100 µg/mL de penicilina e estreptomicina, e 1,6% de L-Glutamina. Uma vez comprovada atividade do extrato bruto e/ou suas frações sob a linhagem tumoral células MDA-MB-231, estas também foram testadas sobre a linhagem A549 (ATCC[®], CCL-185) linhagem de adenocarcinoma alveolar humano, nas mesmas condições descritas para a linhagem MDA-MB-231, mas utilizando o meio MEM Cultilab[®].

4.4.1.2 Ensaio para determinação da atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e suas frações

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada também pela técnica de MTT em células tumorais, conforme descrito anteriormente no item 4.4.1.2 com adaptações. Para a realização do método, 100 µL de suspensão celular foram plaqueadas em placas de 96 poços, em concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço e, incubadas em estufa, a 37°C, por 24 h, em atmosfera de 5% de CO₂ utilizando meios de cultura suplementados DMEM (Sigma®) para a linhagem MDA-MB-231, e MEM (Cultilab®) para a linhagem A549. Em seguida as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato bruto e suas frações (1000 a 7,81 µg/mL) e, incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ por 72 h. Como controle de atividade utilizou-se o fármaco padrão Paclitaxel a 35 µg/mL e controle de viabilidade as células contendo somente o meio DMEM ou MEM suplementados (controle de crescimento). Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3000 rpm, durante 15 minutos, e o sobrenadante contido em cada poço foi removido e substituído por 100 µL de meio contendo MTT a uma concentração final de 0,5 mg/mL. A placa foi então novamente incubada, protegida da luz em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ por 4h, conforme padronizado por MOSMANN *et al.*, (1983). Decorridas quatro horas de incubação, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos; e o meio de cultura com MTT foi removido de todos os poços, e, em seguida, adicionados aos poços 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais. Cada poço foi cuidadosamente homogeneizado, as placas foram agitadas por 10 minutos em agitador orbital, determinando-se, posteriormente, a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. Os resultados obtidos foram usados para a determinação da viabilidade celular, a qual foi determinada por comparação entre a absorbância do controle de crescimento celular, que corresponde a 100% de viabilidade celular.

4.4.2 Avaliação da Atividade antitripanosomatídeos

A triagem das atividades tripanocida e leishmanicida do extrato bruto e frações foram realizadas inicialmente nas formas extracelulares: epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Leishmania* sp.

4.4.2.1 Avaliação da atividade Tripanocida

4.4.2.1.1 Cepa e Manutenção

A cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada no presente estudo foi a Colombiana, isolada de um caso humano na Colômbia (FEDERICI *et al.*, 1964), que corresponde a um modelo que apresenta resistência ao fármaco benznidazol, conforme determinado por FILARDI & BRENER (1987). Essa cepa foi cedida pelo Laboratório de Doenças de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP. As formas epimastigotas da cepa Colombiana foram mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido no banco de cepas do Laboratório de Doenças Parasitárias, da UFVJM, em meio LIT contendo 30% de glicerina. Para a execução dos experimentos, as formas epimastigotas foram inicialmente descongeladas a temperatura ambiente e transferidas para tubos cônicos de 15 mL (Global®). Depois de adicionar 100 µL de meio LIT, os tubos foram incubados em estufa incubadora B.O.D (demanda bioquímica de Oxigênio; SL 200/364 Solab® Científica), a 26°C, por 24 horas. Após esse tempo, as culturas foram centrifugadas (Termo®, modelo BR4i multifunction) a 3000 rpm, por 15 minutos, a temperatura ambiente, para a eliminação da glicerina utilizada no congelamento. O sobrenadante foi então desprezado, e o sedimento ressuspensionado em 1 mL de meio LIT. Os tubos foram novamente incubados em estufa B.O.D (Solab®) a 26°C. No início do cultivo, as culturas foram analisadas a cada três dias e depois de estabelecido o seu crescimento foram submetidas a crescimento exponencial para a obtenção de uma quantidade de formas epimastigotas suficiente para realização dos experimentos.

4.4.2.1.2 Ensaio para determinação da atividade tripanocida do extrato bruto e suas frações sobre formas epimastigotas

No ensaio da atividade tripanocida, também foi empregado o método de MTT descrito por MOSMANN *et al.* (1983). Na fase exponencial de crescimento, uma suspensão de 4×10^7 parasitos/mL foram transferidos para um erlenmeyer com 20 mL de LIT q.s.p., na proporção de uma parte de cultura rica para uma de meio LIT, as quais foram observadas diariamente em microscópio óptico (Olympus®). Esta foi incubada em estufa B.O.D (Solab®), a 26°C durante sete dias para atingir a fase estacionária de crescimento (OLIVEIRA, 2016).

Uma vez atingida esta fase estacionária, os parasitos foram quantificados e 50 µL da suspensão de epimastigotas na concentração de 4×10^7 parasitos/poço foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços (Sarstedt®). Em seguida, a cada poço foram adicionados 50 µL das soluções contendo diferentes concentrações do extrato bruto e das suas frações (125; 250; 500; 1000 µg/mL). Diferentes controles foram adicionados ao experimento: fármaco padrão, benznidazol, foi utilizado na concentração de 75 µg/mL como controle de morte dos parasitos. Como controle de crescimento parasitário ou de viabilidade foi utilizado o meio LIT e parasitas; controles do extrato e suas frações (concentração dos compostos testes sem a presença dos parasitas); controle do solvente (meio LIT com 0,125% de DMSO na presença de parasitas) e controle de esterilidade do meio LIT. Na sequência, foram incubadas em estufa B.O.D. (Solab®), a 26°C, por 72 horas, protegidas da luz. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm, por 30 minutos em centrífuga (Thermo®), o sobrenadante então foi removido e, posteriormente, foi adicionado a cada poço 100 µL de uma solução de LIT com MTT a 5,0 mg/mL. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições, por 4 horas, protegidas da luz. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, por poço e após completa solubilização do formazano realizou-se a medida da absorbância em leitor de microplaca (Molecular Devices®) a 540 nm. O extrato, suas frações e/ou compostos isolados e os controles foram testados em triplicata em três experimentos independentes.

4.4.2.2 Avaliação da Atividade Leishmanicida

4.4.2.2.1 Cepas e Manutenção

Foram utilizadas neste ensaio duas cepas de *Leishmania* sp. para a realização da atividade leishmanicida: a cepa PP75 - *Leishmania (leishmania) infantum* (MHOM/BR/74/PP75) agente da forma visceral da leishmaniose; e a cepa M2269 - *Leishmania (leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil. As cepas foram cedidas pelo laboratório de *Imunopatologia* (LIMP) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP. As formas promastigotas destas espécies foram mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido no banco de cepas do Laboratório de Doenças Parasitárias, da UFVJM, em meio LIT contendo 30% de glicerina. O

descongelamento para a obtenção das formas promastigotas das cepas PP75 e M2269 foram realizados conforme descrito no item 4.4.3.1.2. para as formas epimastigotas do *T. cruzi*.

4.4.2.2.2 Ensaio para determinação da atividade leishmanicida do extrato bruto e suas frações sob formas promastigotas

Da mesma forma, a avaliação da atividade leishmanicida foi realizada por meio do método de MTT como descrito por MOSMANN *et al.* (1983). As formas Promastigotas das cepas PP75 e M2269 foram obtidas no início da fase estacionária ao final de sete dias de crescimento e conforme a metodologia descrita no item 4.4.3.1.3 (OLIVEIRA, 2016). Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 4.4.3.1.3 para avaliação da atividade tripanocida. A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão na concentração de 50 µg/mL e como controle de crescimento dos parasitos foi utilizado meio LIT e parasitas. Controles das substâncias testes (concentração do extrato bruto e suas frações sem a presença dos parasitas); controle do solvente (meio LIT com 0,125% de DMSO na presença de parasitas); e controle de esterilidade do meio LIT também foram adotados.

4.4.3 Avaliação da Atividade Antibacteriana

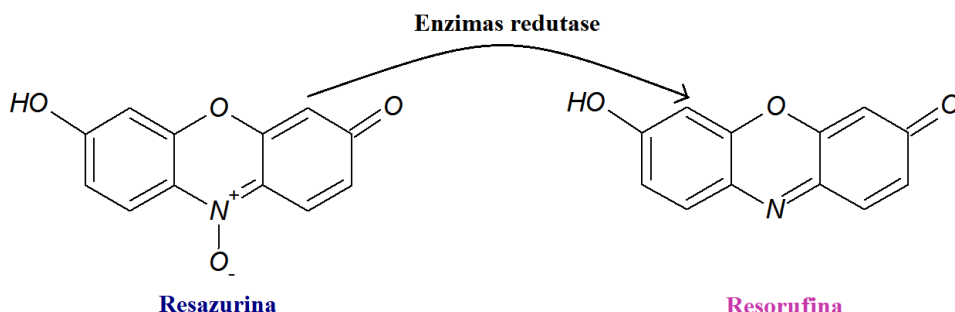
4.4.3.1 Bactérias e Manutenção

Foram utilizadas oito cepas de bactérias provenientes da coleção de cultura *American Type Culture Collection* (ATCC, Rochville, MD, USA), que foram cedidas pela Universidade Federal de Minas Gerais, as espécies de bactérias são: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25931), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29313), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 49131), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778). As cepas foram criopreservadas em criotubos contendo caldo BHI com 30% de glicerol e foram mantidas a -20 °C. Para a realização dos ensaios elas foram descongeladas a temperatura ambiente, repicadas em um meio BHI sólido (Himedia®), em capela de fluxo laminar (Veco®) e incubadas a 37 °C, por 24 horas em estufa bacteriológica (Solab®, modelo SL 101).

4.4.3.2 Ensaio para determinação da atividade antibacteriana do extrato bruto e suas frações

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por meio da técnica de microdiluição em placas de 96 poços, conforme a metodologia descrita na norma M7-A6 do Manual CLSI (2003) para as bactérias de crescimento aeróbico, com algumas adaptações. Para a avaliação da atividade antibacteriana foi utilizado o corante 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido (Resazurina) (Sigma®). A Resazurina, que também é conhecida como Alamar Blue, permite determinar a viabilidade de uma célula por sua função mitocondrial, isto se deve, pois somente células viáveis são capazes de reduzir a Resazurina (cor púrpura-azul) em Resorufina (cor róseo-fluorescente) (ELSHIKH, AHMED & BANAT, 2016) - Figura 7. A formação deste tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN *et al.*, 2000; RISS *et al.*, 2016). Assim sendo, a observação da coloração azul é indicativo de ausência de crescimento celular, enquanto a observação da coloração rosa, indica a presença de crescimento.

Figura 7: Redução da resazurina em resorufina.



Para realização dos ensaios, inicialmente, obteve-se uma suspensão bacteriana, dos quais foram retiradas de duas a três colônias de bactéria que foram colocadas em cultura de 24 horas em meio BHI sólido (Himedia®) para crescimento. Posteriormente, as bactérias foram ressuspensas em solução salina 0,09% estéril, até atingir turvação igual à suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. A concentração foi também confirmada por meio da leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro (Biospectro®) a 625 nm, com faixa de absorbância entre 0,08 a 0,1, que corresponde a uma suspensão de aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL. Na sequência, 1 mL dessa suspensão foi diluída em 9 mL de Caldo Muller Hinton (Himedia®), obtendo uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, que foi a utilizada

nos ensaios, sendo distribuídos 50 µL/poço em placas de 96 poços (Sarstedt®) juntamente com 50 µL do extrato bruto e suas frações nas diferentes concentrações testadas. Foram utilizados os seguintes controles: de esterilidade do meio (caldo Muller Hinton sem suspensão bacteriana), do solvente (caldo Muller Hinton com 0,125% de DMSO na presença da suspensão bacteriana) controle dos extratos nas concentrações testadas (sem suspensão bacteriana), controle de viabilidade (meio Muller Hinton na presença de suspensão bacteriana) e controle de morte bacteriana (fármaco padrão cloranfenicol a 30µg/mL). Foram realizadas triplicatas dos experimentos e das concentrações testadas. Depois da adição de todos os extratos e controles as placas foram agitadas por 15 minutos em agitador orbital (Fanem®) e incubadas por 24 horas, em estufa bacteriológica (Solab®), a 37°C.

4.4.4 Avaliação da Atividade Antifúngica

4.4.4.1 Fungos Leveduriformes e Manutenção

Para a atividade antifúngica foram utilizadas três espécies de leveduras: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 34135) e *Candida tropicalis* (ATCC 28707), fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro).

Essas espécies foram criopreservadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFVJM, após expansão em caldo YPD (2% de glicose, 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de ágar) e adição de 30% de glicerol, sendo mantidas em freezer – 20 °C. Para a realização dos ensaios as leveduras foram descongeladas a temperatura ambiente, repicadas em meio Agar Sabouraud (Himedia®) em capela de fluxo laminar (Veco®) e incubadas em estufa bacteriológica (Solab®), por 48 horas, a 37 °C.

4.4.4.2 Ensaio para determinação da atividade antifúngica do extrato bruto e suas frações

A suspensão para realização dos ensaios foi obtida por meio da retirada de duas a três colônias de leveduras de uma cultura de 48 horas em meio sólido Ágar Sabouraud (Himedia®), do qual foram ressuspendidas em solução PBS estéril, até atingir turvação igual à suspensão correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, a concentração foi confirmada por meio da leitura espectrofotométrica em espectrofotômetro (Biospectro®) a 30 nm, com faixa de transmitância entre 0,25 a 0,30. Uma absorbância dentro desta faixa significa que ali contém cerca de 1×10^6 a 5×10^6 células/ mL. Posteriormente, essa suspensão

foi diluída na proporção de 1:20 com meio RPMI tamponado, resultando em uma suspensão na concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células/mL. Para os ensaios foram utilizadas placas de 96 poços (Sarstedt®) e em cada poço foram adicionados 50 µL do inóculo da suspensão de microorganismo e 50 µL das diferentes concentrações do extrato bruto e suas frações (125; 250; 500 e 1000 µg/mL). Foram utilizados os seguintes controles: de esterilidade do meio (meio RPMI tamponado com Mops), do solvente (RPMI tamponado com Mops com 0,125% de DMSO e suspensão fúngica), controle dos extratos nas concentrações testadas (sem suspensão fúngica), controle de viabilidade (meio RPMI tamponado com Mops) e controle de morte ou fármaco padrão (anfotericina B a 4µg/mL). Foram realizadas triplicatas dos experimentos e das concentrações dos extratos e dos controles testados. Depois da adição de todas as substâncias teste e controles, as placas foram agitadas por 15 minutos, em agitador orbital (Fanem®) e incubadas em estufa bacteriológica (Solab®), a 37 °C durante 48h.

Posteriormente, a mesma metodologia descrita no item 4.4.4.2 foi empregada para a avaliação da atividade antifúngica (Resazurina).

4.4.5 Avaliação da Citotoxicidade

4.4.5.1 Linhagem Celular e Manutenção

Para a avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações foram utilizadas duas linhagens de células, a CLL I NCTC da American Type Culture Collection (ATCC) 929-clone da linhagem L, proveniente de tecido conjuntivo de camundongo, denominada L929, a qual foi fornecida pelo Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP); e a linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATCC TIB-71), uma linhagem de macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de leucemia Abelson, obtidos da ascite de ratos BALB/c (RASCHKE, 1978; ABELSON, 1970), a qual foi fornecida pelo Laboratório de Imunologia (LABIMUNO) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

Para a realização dos ensaios, criotubos contendo as linhagens criopreservadas foram descongelados a temperatura ambiente. A suspensão foi transferida para uma garrafa de cultura estéril de 75 cm² (TPP ®), contendo 9 mL de meio RPMI ou MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®), 1% de solução estabilizada de penicilina (1000 U/mL)/estreptomicina (10 µg/mL) (Sigma®) e 2 mM de L-Glutamina (Sigma®). Estas foram

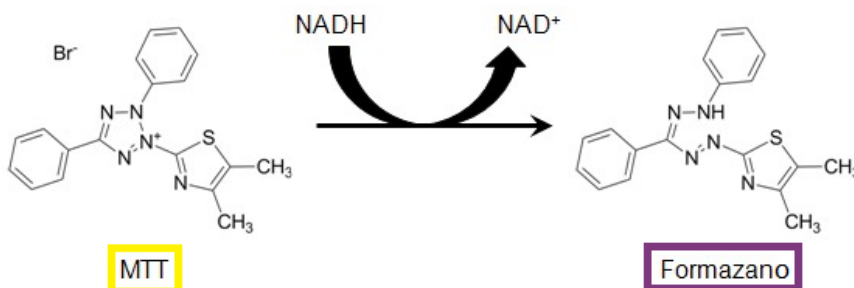
incubadas em estufa (Ultrafase®, modelo HF 212 UV), a 37°C, em atmosfera umidificada a 95% e com 5% de dióxido de carbono (CO₂), até atingirem 80% de confluência, sendo que a verificação foi realizada diariamente em microscópio óptico invertido (Meddilux, modelo MDL 150 TAI) e a troca do meio realizada quando necessário. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e foi adicionado 1 mL de solução de tripsina-EDTA (Sigma®) para promover a dispersão da monocamada celular. Depois das células desprendidas, a tripsina foi inativada pela adição de 9 mL do meio RPMI ou MEM suplementado. A suspensão de células foi concentrada por meio da centrifugação (2500 rpm, 18°C, 10 minutos), em centrífuga (Thermo®), modelo BR4i multifunction) e, ressuspensas em meio RPMI suplementado. Dessa suspensão retirou-se uma alíquota de 20 µL, a qual foi adicionado o corante Azul de Tripán 0,4% para contagem em câmara de Neubauer, sendo a concentração de células ajustada para 1×10^5 células/mL no caso da linhagem L929 e, de $1,5 \times 10^5$ células/mL no caso da linhagem RAW para a realização dos experimentos de citotoxicidade, conforme estabelecido por Oliveira (2016).

4.4.5.2 Ensaio para determinação da citotoxicidade do extrato bruto e suas frações

A viabilidade celular avaliada após exposição aos extratos (bruto e frações), foram avaliadas pela técnica do 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme descrito por MOSMAN e colaboradores (1983). Essa técnica baseia-se na atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, que reage com o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio, levando a redução e posterior formação dos cristais de formazano, que é um composto colorido (Figura 8) e, solúvel em alguns solventes orgânicos como o DMSO. Somente células (mitocôndrias) viáveis podem realizar essa redução do corante, logo, a quantidade de formazano formado é diretamente proporcional à viabilidade celular (Figura 9), podendo ser medida em espectrofotômetro de múltiplos poços (leitor de microplaca) (MOSMANN *et al.*, 1983; MUJEEB, KHAN & PATHAK 2018; DUTTA *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008). Em placas de 96 poços (Sarstedt®) foi adicionado 100 µL da suspensão celular na concentração de 1×10^5 ou $1,5 \times 10^5$ células/mL dependendo da linhagem celular, conforme padronizado por OLIVEIRA (2016). Estas células foram incubadas por 24 horas em estufa, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, posteriormente o meio foi removido cuidadosamente para não retirar as células aderidas. Em seguida, as células L929 foram tratadas com concentrações seriadas do extrato bruto e suas frações (1000; 500; 250; 125;

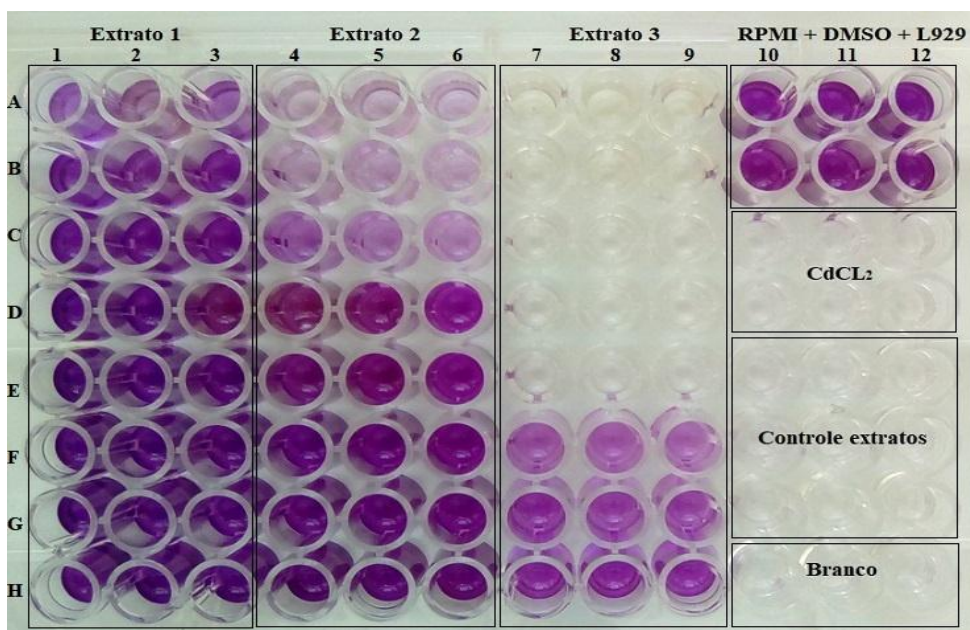
62,5; 31,25; 15,62; 7,81 $\mu\text{g/mL}$) e, para as células RAW nas concentrações de (125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,97 $\mu\text{g/mL}$). No ensaio foram adicionados à placa um controle de crescimento celular (células e meio RPMI ou MEM suplementado), controle de morte celular para a linhagem L929 (CdCl_2 a 360 $\mu\text{g/mL}$ e células) e, Paclitaxel a 35 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem de células RAW; controle de solvente (meio na presença de DMSO a 0,125% e células); controle dos extratos brutos e suas frações e, controle do meio RPMI ou MEM. Todas as amostras foram testadas em triplicata e em três experimentos independentes.

Figura 8: Reação de oxi-redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- Difeniltetrazólio (MTT) em formazano após a conversão pela enzima succinato desidrogenase.



Adaptado de RISS *et al.*, (2016).

Figura 9: Representação da microplaca após redução do MTT e formação dos cristais de formazano, que é diretamente proporcional a viabilidade celular.



Linhas A-H: diluições do extrato a partir de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Linhas 10, 11 e 12: controles: de crescimento (L929+DMSO+RPMI); de morte (CdCl_2 20 mM); dos extratos e o branco (só meio RPMI).

Após adição das substâncias testes, as células foram incubadas em estufa de CO₂ (Ultrafase®) nas mesmas condições anteriores, por um período de 72 horas, ao abrigo da luz. Depois desse período, o meio foi removido e foi adicionado em cada poço 100 µL de solução de MTT a 0,5 mg/ml em RMPI ou MEM suplementado. A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade, por 4 horas. Após esse período, a placa foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e foi adicionado a cada poço, 100 µl de DMSO (Vetec®) para solubilização dos cristais de formazano que foram formados pela redução das enzimas mitocondriais. A placa então foi submetida à leitura da absorbância em leitor de microplaca (Molecular Devices®) a 540 nm.

4.5 Parâmetros para avaliação das atividades biológicas promissoras: determinação e avaliação da IC₅₀, do Índice de Seletividade (IS) e da Eficácia

Alguns parâmetros foram considerados para análise dos resultados, a fim de selecionar as substâncias teste mais promissoras (dentre as frações), em comparação com os seus respectivos fármacos padrões avaliados no presente estudo, para prosseguimento do estudo biomonitorado. Para os ensaios de atividade antitumoral, tripanocida, leishmanicida e de citotoxicidade, foi utilizado o Software GraphPad Prism 5.0 para obtenção dos gráficos e resultados referentes as IC₅₀, que corresponde à concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade das células. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) e intervalo de confiança de 95%.

A citotoxicidade frente às células L929 foi comparada com a atividade frente às células tumorais (MDA-MB-231 e A549), frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Colombiana) e frente às formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1070/BH46) e de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), em que calculou-se o índice de seletividade (IS), que avalia o quanto um composto é ativo frente as células tumorais ou parasitárias sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos (L929). Para calcular o IS, deve-se fazer a razão do CC₅₀ de células de mamífero/IC₅₀ de células tumorais ou parasitárias). Foram considerados seletivos, aqueles extratos (bruto e frações) que tiveram IS maior ou igual a 2,0, o que sugere que o extrato avaliado é duas vezes mais ativo frente às células tumorais ou parasitas, conseqüentemente, menor efeito ela tem sobre as células de mamífero (SUFFNES & PEZZUTO, 1991).

Calculou-se ainda, a eficácia das substâncias testes frente às células tumorais ou parasitárias (Eficácia= atividade do fármaco padrão/atividade dos compostos teste) x 100. A atividade apresentada pelos compostos testados foram comparadas com a atividade dos fármacos padrões frente a células tumorais e parasitos.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.0 Software Inc.. Para análise da normalidade dos dados o teste Shapiro-Wilk será utilizado e, as diferenças entre as variáveis com distribuição normal foram testadas utilizando ANOVA com pós-teste de Tukey. Para as variáveis com distribuição assimétrica, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de *Dunns* ou ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$, adotando intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizada a análise fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de extratos e frações das partes aéreas da *E. erythropappus*, proveniente do Cerrado, do município de Diamantina, região do Vale do Jequitinhonha, MG. Com o intuito de facilitar a apresentação e compreensão dos resultados, os dados foram divididos em duas seções: a) a primeira compreende aqueles referentes à análise fitoquímica da planta avaliada neste estudo e, b) a segunda aos dados da avaliação das atividades biológicas da espécie vegetal.

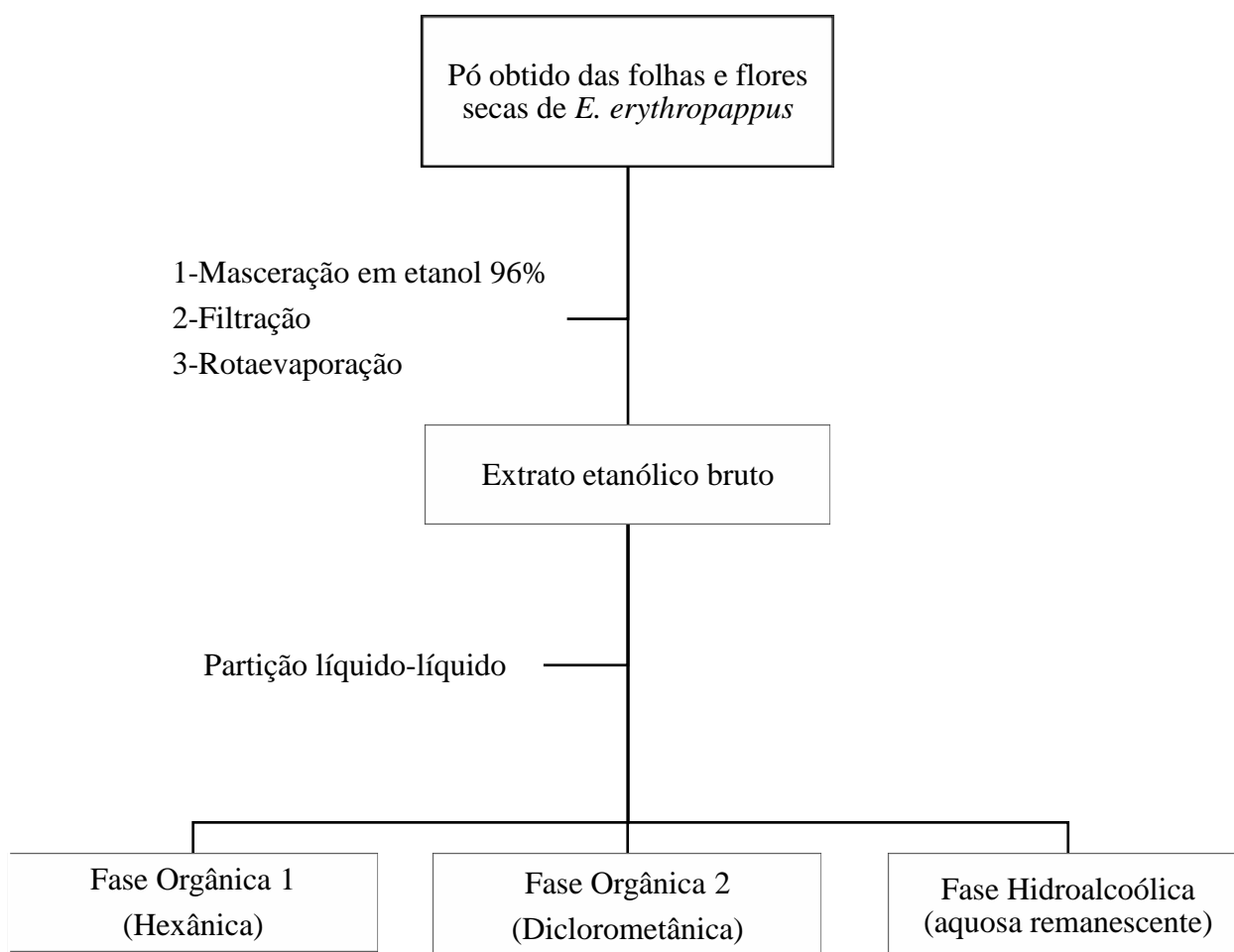
5.1 Análise Fitoquímica

5.1.1 Obtenção do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações

A figura 10 resume as etapas em que o pó foi submetido até a obtenção das frações, após processamento das partes aéreas de *E. erythropappus*. Após secagem e trituração do material vegetal foram obtidos 565,90 g de pó das folhas e flores, que submetidas a maceração em etanol 96%, resultaram em 56,816 g de extrato bruto, que representou um rendimento de 10,4%. Uma alíquota de 46,645 g do extrato etanólico bruto (82,09%) foi utilizada para realizar a partição líquido-líquido com solventes em polaridade crescente, obtendo-se as frações (hexânica – diclorometânica – hidroalcoólica). O restante do extrato etanólico bruto (10,171 g – 17,91%) foi utilizado para realização dos ensaios biológicos.

Ao realizar a partição líquido-líquido com os solventes (hexano, diclorometano e metanol), foi possível obter 2,42 g da fase hexânica, 6,17 g da fase diclorometânica e 10,63 g da fase hidroalcoólica (aquosa remanescente), que correspondem a 5,18; 13,22 e 22,79% de rendimento respectivamente. Da mesma forma, porções das três frações obtidas (600 mg) foram utilizadas para realização dos ensaios biológicos, e o restante separado para as análises cromatográficas e os processos cromatográficos preparativos.

Figura 10: Fluxograma das etapas de obtenção do extrato etanólico bruto e suas frações a partir das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish.



5.1.2 Análise e identificação de substâncias a partir das frações

A análise fitoquímica das frações obtidas a partir do extrato bruto das partes aéreas de *E. erythropappus*, foi realizada no intuito de contribuir para o melhor conhecimento do perfil químico desta espécie e em particular, deste extrato utilizado na realização dos ensaios biológicos. Embora, existam na literatura vários estudos concernentes a esta espécie, estes avaliaram o óleo essencial obtido das folhas e inflorescências (SOUSA *et al.*, 2008; SILVÉRIO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015a; SALUSTIANO *et al.*, 2006). Estudos relacionados a extratos com diferentes polaridades ainda são escassos e, estes extratos e

frações poderiam ser promissores para busca de novas substâncias bioativas em decorrência das diferenças esperadas em sua constituição química (MACIEL *et al.*, 2002; CECHINEL & YUNES, 1998). A seguir, foram descritos os resultados obtidos para cada uma das frações avaliadas.

5.1.2.1 Fase Hexânica

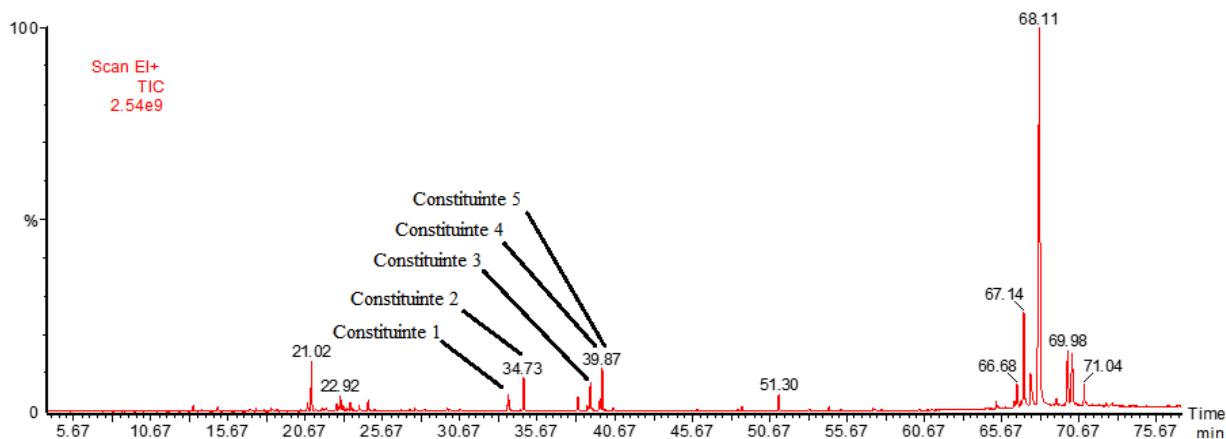
Parte da fase hexânica obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *E. erythropappus* foi analisada por CG-EM e outra parte foi submetida à cromatografia em coluna (2 g), obtendo-se 20 sub-frações de aproximadamente 10 mL. Estas foram posteriormente reunidas em grupos por similaridade cromatográfica (CCD), utilizando como agentes reveladores a radiação UV e a vanilina sulfúrica (100-110° C). No entanto, não foi possível o isolamento de constituintes químicos, uma vez que as sub-frações reunidas apresentavam perfis químicos complexos e massas insuficientes para se empregar outros processos de purificação.

5.1.2.1.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

O cromatograma obtido a partir das análises da fração hexânica por CG/EM está representado na Figura 11. O cromatograma apresentou um número significativo de picos, que geraram vários espectros, indicando que a amostra analisada se trata de misturas complexas de constituintes. Os espectros de cada pico obtido foram comparados com aqueles da biblioteca Nist 08 (*National Institute of Standards and Technology*). Os demais picos presentes no cromatograma não foram identificados pela biblioteca Nist 08.

A partir dos espectros de massas gerados, foi proposta a identificação de alguns dos constituintes da amostra analisada. Os espectros obtidos comparados com aqueles da biblioteca Nist 08, foram analisados quanto ao padrão de fragmentação e comparados aos dados na literatura. Esta análise permitiu propor a identificação de cinco constituintes na fração hexânica (Tabela 7).

Figura 11: Cromatograma da fração hexânica do extrato etanólico das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, obtido através da Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.



Constituintes 1- 5 foram os picos dos compostos identificados para esta fração.

Tabela 7: Proposta de identificação de constituintes da fração hexânica do extrato etanólico das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.

Pico CG/EM	Constituinte proposto	Tempo de retenção (min)	CAS
1	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (Ácido Palmítico)	33,78	57-10-3
2	Hexadecanoato de etila (Palmitato de etila)	34,73	628-97-7
3	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol)	38,25	102608-53-7
4	Ácido linolênico	39,12	463-40-1
5	Linolenato de etila	39,87	1191-41-9

CAS: American Chemical Society - Número de registro de espécies químicas.

A seguir são apresentados os espectros de massas e discutidas as estratégias para se propor a identificação dos cinco constituintes presentes na fase hexânica, bem como a estrutura e peso molecular de cada composto.

O constituinte ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico) (figura 12), identificado na fração hexânica, apresentou tempo de retenção de 33,78 min. O ácido palmítico também foi identificado por PINTO (2016) na fração hexânica proveniente da espécie *E. erythropappus*, representando o principal constituinte analisado (11,16%) por CG/EM.

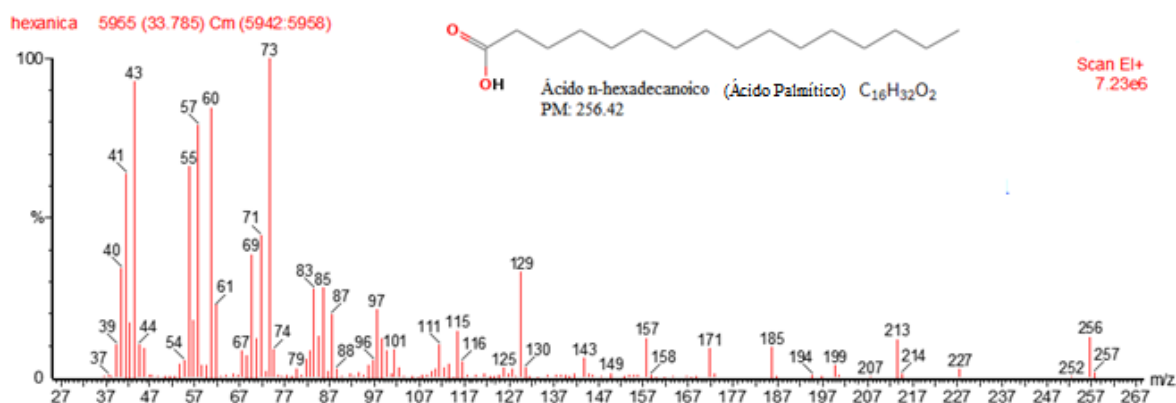
FORMISANO e colaboradores (2012) também identificaram o ácido *n*-hexadecanoico em outras espécies desta família. Na análise do óleo essencial das partes aéreas de *Anthemis mixta* L. (Asteraceae), este foi o principal constituinte identificado pelo CG/EM, representando 15,2% dos constituintes. Esses dados indicam que o ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico), é um composto comumente encontrado em espécies vegetais, principalmente em frações apolares como a hexânica.

Este ácido graxo forma uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares. Através dos seus íons moleculares, os ácidos graxos podem ser caracterizados pela espectrometria de massas, gerados a partir de um rearranjo com transferência dupla de hidrogênios, formando um íon de razão m/z com massa molecular do ácido mais um hidrogênio [M_{Ac} (massa molecular do ácido) + 1]. Assim, podendo determinar a presença do ácido hexadecanoico a partir do íon de m/z 257 (SIQUEIRA *et al.*, 2003).

Alguns íons mais abundantes também são observados, por exemplo, o pico em m/z 60 é referente ao íon produzido por rearranjo de McLafferty com quebra da ligação β em relação à carbonila de ácidos alifáticos. Íon de m/z 227 refere-se a um rearranjo envolvendo a expulsão de duas unidades de carbono (C2 a C3) e; m/z 213, representando um rearranjo envolvido na eliminação de três carbonos (C2 a C4), como com derivados de éster metílico (CRISTIE, 2018).

As quebras sucessivas das ligações C-C são responsáveis por outros fragmentos, na qual ocorre retenção de carga pelo fragmento alquila (m/z 43, 85, 99), formado pela remoção de um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto; ou pelo fragmento que contém o oxigênio (m/z 73, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199) com intervalos de 14 unidades de massas (CH_2), que são comuns em hidrocarbonetos e seus ácidos carboxílicos correspondentes (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Figura 12: Espectro de massas obtido pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico).

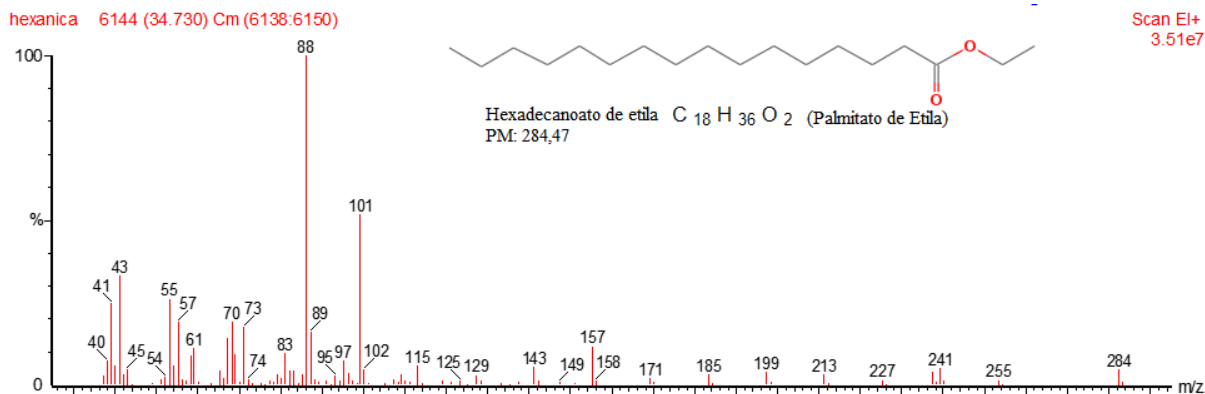


PM: Peso molecular.

Outro composto identificado na fração hexânica foi o Hexadecanoato de etila (Figura 13), apresentando tempo de retenção de 34,73 min, também conhecido como Palmitato de Etila.

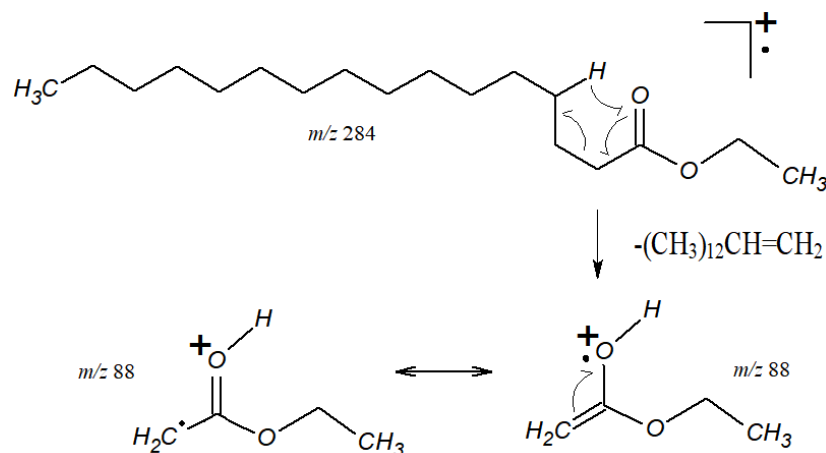
Quando se analisa o espectro de massas do palmitato de etila é observada a presença de dois picos intensos característicos, um em razão m/z 88 (pico base) referente a um rearranjo de McLafferty (Figura 14), seguido da quebra da ligação β em relação ao grupo $C=O$ e, outro em m/z 101 correspondente à quebra da ligação γ à carbonila. Outros picos de menor intensidade (m/z 284, 115 e 73) são correspondentes ao íon molecular, à clivagem δ a carbonila e à clivagem α a carbonila, respectivamente (SIMÕES 2007).

Figura 13: Espectro de massas obtido pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do Hexadecanoato de etila (Palmitato de Etila)



PM: Peso molecular.

Figura 14: Proposta de fragmentação do palmitato de etila mostrando o fragmento oriundo do rearranjo de McLafferty



É observada também, a presença de outros íons característicos: em m/z 255, o pico se refere à perda do grupo etila; em m/z = 241 o pico formado se refere a uma reação de rearranjo que acontece levando a expulsão de um fragmento de três moléculas de carbono (C2 a C4) e; em m/z 239 que representa a perda do íon etóxido (RYHAGE & STENHAGEN, 1959).

Não existem na literatura estudos que demonstram a presença desta substância na espécie *E. erythropappus*, nem em espécies do mesmo gênero. Contudo, esta já foi isolada em espécies da mesma família botânica. Por exemplo, TAVARES (2014) avaliaram a composição do extrato hexânico das folhas de *Eschweilera ovalifolia* DC. (Asteraceae) e, observaram a presença do Hexadecanoato de etila. Em outro estudo, MARTINS (2012) também identificou tal substância, ao realizar a análise de CG/EM do óleo essencial da flor de *Vernonia brasiliiana* L. (Asteraceae), com rendimento de aproximadamente 0,73% deste composto.

A terceira proposta de constituinte na fração hexânica de *E. erythropappus* foi o álcool 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol, apresentando tempo de retenção de 38,25 min, é conhecido como Fitol (figura 15). NUNES (2016) ao analisar a molécula Fitol por CG/EM observou que seu espectro de massas apresentou picos que correspondem a algumas fragmentações, por exemplo: m/z 278 referente à perda de água e, m/z 123, referente à perda de dois radicais de isopreno pelo fragmento m/z 278.

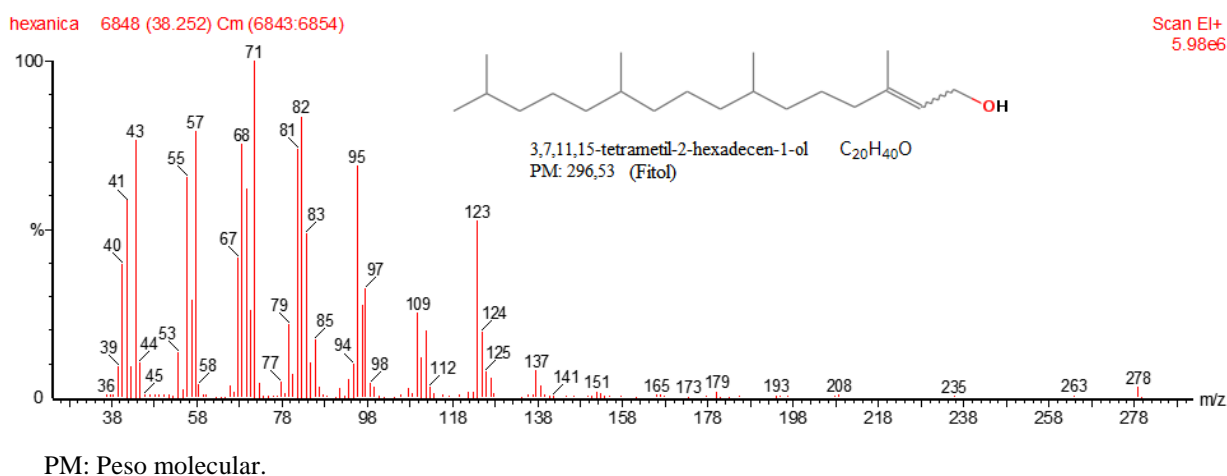
BYJU e colaboradores (2013) relatam que o pico de maior intensidade demonstrado pela m/z = 71 refere-se ao pico do íon base. Quando existe a presença de um pico em m/z =

296 é caracterizado pelo íon molecular, que indica a massa molecular do composto. Contudo, a molécula de Fitol ($C_{20}H_{40}O$) geralmente apresenta ausência do pico do íon molecular, segundo OLIVEIRA (2012) isto ocorre porque em alcoóis primários, este pico é pouco intenso e de difícil visualização. ALTOÉ (2014) relata que esta característica deve estar relacionada à perda da molécula de água do álcool, que pode ser térmica ou causada pela fragmentação do íon molecular. No caso de análises por CG/EM, geralmente essa perda é térmica, pelo fato de que ocorre um grande aquecimento durante a análise.

OLIVEIRA (2012) considera que em um espectro de um álcool que apresenta grupos CH_3 (Metila) como ramificação, seria previsto a presença de um pico razoavelmente intenso em M-33, resultante da perda de uma molécula de água (H_2O) e de um grupo metila. Contudo, o fitol é um álcool de cadeia longa, logo a fragmentação se dá pela frequência de fragmentações atribuídas aos hidrocarbonetos. Esse perfil descrito por vários autores para o espectro de massas do Fitol pode ser observado na Figura 15, assim, se pode propor a presença do Fitol na espécie vegetal objeto deste estudo.

Até o momento, não foram encontrados estudos que relataram a presença do Fitol em espécies do gênero *Eremanthus*. Contudo, outras espécies da família Asteraceae também apresentaram em sua composição esta substância; por exemplo, SOETARDJO e colaboradores (2007) avaliaram a composição química da espécie *Centipeda minima* L. por CG/EM e mostraram que, um dos componentes majoritários identificados foi à molécula de fitol, apresentando aproximadamente 6,21% de rendimento.

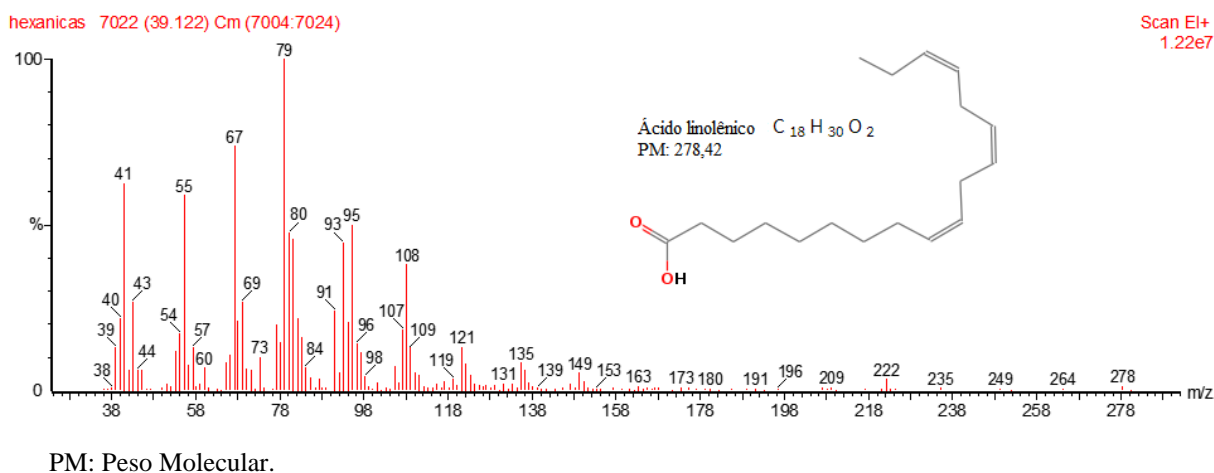
Figura 15: Espectro de massas obtido pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol).



O Ácido Linolênico, identificado no tempo de retenção 39,12 min, é um ácido graxo poli-insaturado, pertencente à família dos ácidos graxos (ômega-3) e, que também foi identificado na fração hexânica das partes aéreas de *E. erythropappus*. Possui pico base em m/z 79 (figura 16), o que muito provavelmente se deve a perda do íon ciclohexadienil (THURNHOFER & VETTER, 2005). O pico de m/z 108 também é característico dos ácidos graxos, definido por um grupo n - terminal (íon ômega) (CRISTIE, 2018). De acordo com PARDO (2010), o mecanismo pelo qual ocorre a fragmentação dos ácidos poli-insaturados, como o ácido linolênico, é através da transferência de ligações duplas e da α – clivagem.

Não foram encontrados na literatura, estudos que demonstrem a presença do ácido linolênico em espécies do gênero *Eremanthus*, mas já foi identificado em outras espécies da mesma família botânica. Em estudo realizado por SHUKLA e colaboradores (2018) foi observada a presença do ácido linolênico após análise de CG/EM dos extratos das folhas e caules da espécie *Cassia tora* Linn. (Asteraceae). Nas folhas foi observada grande concentração desta substância, com rendimento de 16,1%, e no caule, 11,05%. GARCÍA-PÉREZ e colaboradores (2016) avaliaram o perfil de ácidos graxos de *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae) em diferentes polaridades do solvente. Ao realizar o CG/EM, dentre os compostos identificados, revelou-se a presença de ácido linolênico, com rendimento em torno de 7%. MOHADJERANI e colaboradores (2016), avaliaram a composição de ácidos graxos da espécie *Ligularia persica* Boiss., e mostraram que o ácido linolênico foi um dos mais abundantes, com rendimento de 21,8%. Esses dados indicam que tal substância é comumente encontrada em espécies desta família Asteraceae, que podem ser potenciais fontes para isolamento destas moléculas.

Figura 16: Espectro de massas pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do Ácido linolênico.



O último composto da fração hexânica proposto pela biblioteca NIST foi o linolenato de etila, apresentando tempo de retenção de 39,87 min (figura 17), é um éster graxo poli-insaturado (três insaturações). De acordo com SIMÕES (2007), o sinal do íon molecular desta substância se encontra na razão m/z 306.

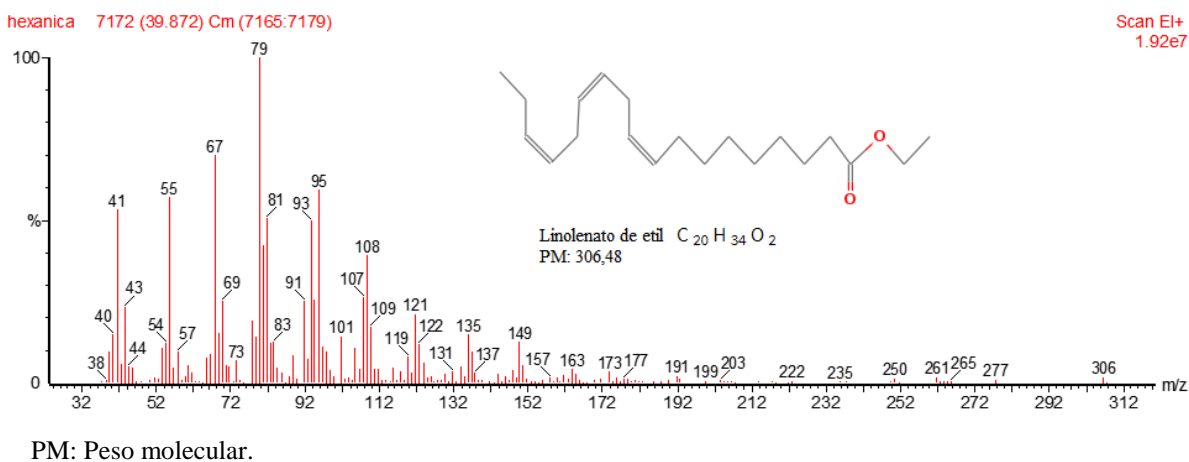
Segundo SIMÕES (2010), os ésteres que apresentam muitas insaturações, como o linolenato de etila, geralmente demonstram íons moleculares com abundância muito baixa, assim como este metabólito, no qual o sinal do íon molecular, encontrado na razão m/z 306, é observado com intensidade em torno de 8% e pode ser visto claramente. Outros sinais de alta intensidade, como em m/z 95, 81 e 67 são provenientes de fragmentações que ocorreram subsequentes na cadeia carbônica do éster graxo.

Tal composto já foi identificado em plantas da mesma família Asteraceae. No estudo realizado por ALMEIDA e colaboradores (2011), ao avaliarem por CG/EM, a fração hexânica das cascas do caule da espécie *Gustavia elliptica* S.A. Mori, encontraram uma quantidade considerável de linolenato de etila, com aproximadamente 14,96% do éster graxo. TUNDIS e colaboradores (2012) avaliaram a composição química de diferentes frações da espécie *Senecio stabianus* Lacaita (Asteraceae) por CG/EM e, também identificaram na fração hexânica, esta substância.

Exceto para o constituinte ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico), não foram demonstradas na literatura, nenhuma das moléculas identificadas nesta fração hexânica para a espécie ou o gênero *Eremanthus*. Provavelmente, essas diferenças podem ser explicadas pelo fato que os estudos foram feitos com o óleo essencial destas espécies (SOUSA *et al.*, 2008; SILVÉRIO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015; SALUSTIANO *et al.*, 2006), e extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades.

Consequentemente, devido os distintos processos de extração, o óleo e as frações podem apresentar, em sua constituição química componentes diferentes.

Figura 17: Espectro de massas pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química do Linolenato de etila.



5.1.2.2 Fase Diclorometânica

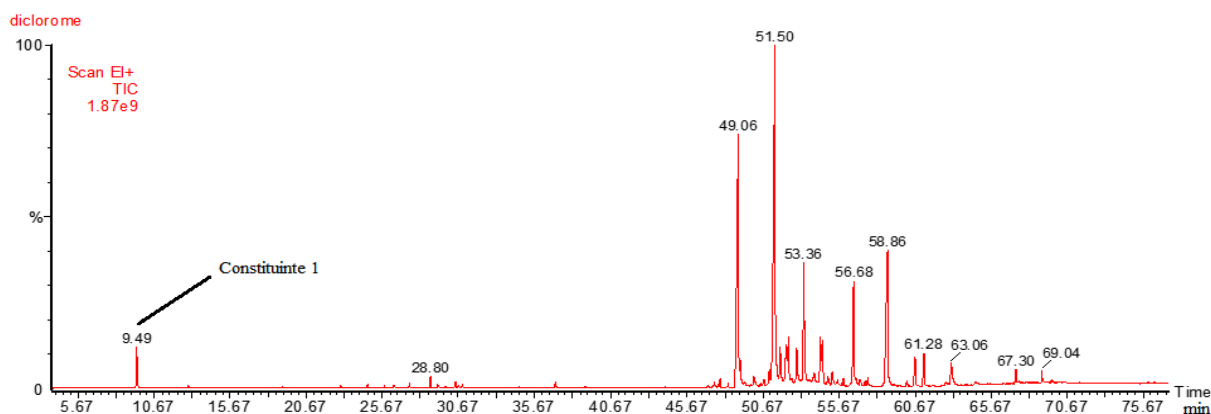
Parte da fase diclorometânica obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *E. erythropappus* foram analisadas por CG-EM e parte (4 g) foi submetida à cromatografia em coluna, obtendo-se 68 frações de aproximadamente 20 mL, reunidas em grupos devido sua similaridade cromatográfica (CCD), obtendo-se 15 sub-frações. Uma sub-fração (F10) 22 mg, aparentemente purificada, foi dissolvida em clorofórmio deuterado, filtrada e submetida à análise em RMN ^1H e ^{13}C em espectrômetro de RMN Fourier-Bruker® 300, localizado no LIPENVALE – do Departamento de Química – UFVJM, contudo, a interpretação do espectro evidenciou mistura de constituintes, não sendo possível a identificação (Figuras 1 e 2 – Anexo B). Não foi possível o isolamento ou identificação de constituintes químicos de outras sub-frações reunidas, uma vez que apresentavam perfis químicos complexos e em quantidades muito pequenas.

5.1.2.2.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

O cromatograma obtido por CG/EM a partir da análise da fase diclorometânica está representado na figura 18. O cromatograma apresentou um número significativo de picos, que geraram vários espectros de massas. Porém, quando comparados os espectros obtidos com aqueles da biblioteca Nist 08 e analisando seus padrões de fragmentação em comparação com a literatura, foi possível identificar apenas um constituinte, a hidroquinona (figura 19). Além

disso, um fragmento característico da hidroquinona e que corresponde à perda de [COH] é o m/z 81 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Figura 18: Cromatograma da fração diclorometânica do extrato etanólico das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, obtido através de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.

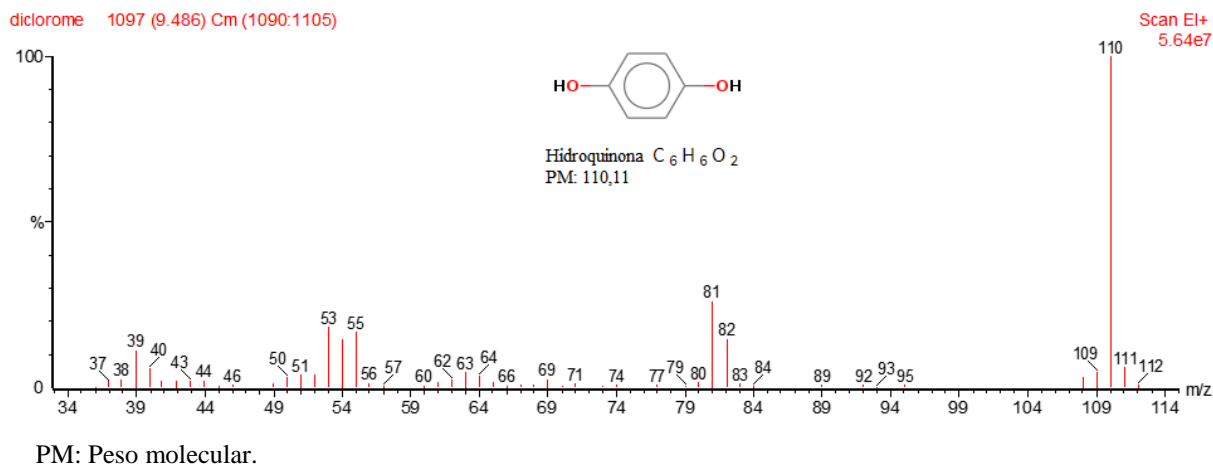


Constituinte 1: único compostos identificado para esta fração. Os demais picos não foram identificados na biblioteca Nist 08.

A Hidroquinona, após análise no CG/EM, apresentou um tempo de retenção de 9,486 min. e foi identificada pela biblioteca NIST pelo número de registro CAS: 123-31-9. A hidroquinona é um derivado fenólico, também conhecido como quinol, hidroquinol, ácido pirogênico. É um composto aromático que apresenta dois grupos hidroxila na posição *para* (VIEIRA, 2006). O espectro de massas apresenta um pico de relação m/z em 110, pico este, que caracteriza a hidroquinona (Figura 19).

Não foram encontrados na literatura, estudos que mostrem a identificação desta molécula em espécies do gênero *Eremanthus*. Contudo, estes utilizaram apenas o óleo essencial das plantas deste gênero. Em plantas da mesma família, que analisaram frações após partição em solventes de diferentes polaridades, também foram relatadas a presença da hidroquinona em sua composição. Por exemplo, ESHIET e colaboradores (2014) mostraram a presença desta molécula no extrato metanólico das folhas e galhos da espécie *Brickellia cavanillesii* Cass.; assim como MANUBOLU e colaboradores (2013) na fração metanólica das folhas de *Senecio tenuifolius* Burm. Desta forma, a hidroquinona é uma substância já identificada em espécies da família Asteraceae, sendo que tal composto é frequentemente obtido quando analisado extratos obtidos com diferentes solventes orgânicos e, em contrapartida, não foi relatado seu isolamento quando é analisado apenas no óleo essencial.

Figura 19: Espectro de massas pela Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e estrutura química da Hidroquinona.



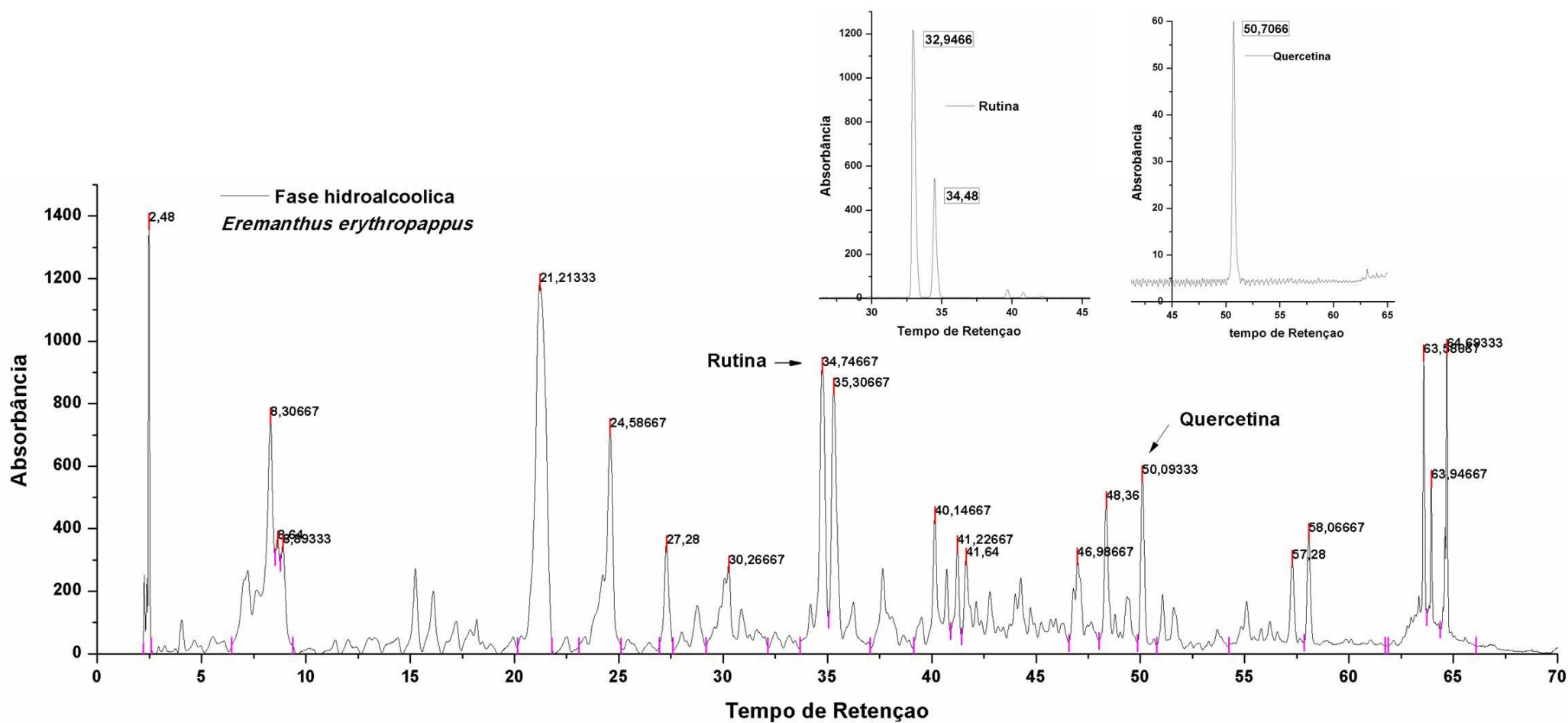
5.1.2.3 Fase Hidroalcoólica (porção aquosa remanescente)

Parte da fase hidroalcoólica (1 g) de *E. erythropappus* foi submetida à cromatografia de exclusão e, parte (100 mg) foi analisada na CLAE-UV. Na cromatografia de exclusão (Sephadex) foram obtidas 52 sub-frações de aproximadamente 20 mL. Estas foram reunidas de acordo com a similaridade de seus perfis cromatográficos (CCD). Não foi possível realizar outros processos para isolamento de constituintes por se tratarem de subfrações com muitos constituintes e com massas reduzidas.

5.1.2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector Ultravioleta (CLAE-UV)

Na figura 20 estão representados os cromatogramas gerados pelo detector UV para a fração hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *E. erythropappus* e para os dois padrões de referência utilizados (quercetina e rutina). Os padrões de flavonóides foram analisados separadamente e nas mesmas condições cromatográficas da amostra, a fim de se comparar os resultados. O cromatograma da CLAE-UV foi registrado a 325 nm.

hidroalcoólica do extrato etanólico das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish e para os padrões de referência, Quercetina e Rutina.



O cromatograma da fração hidroalcoólica apresentou picos com tempos de retenção semelhantes ou próximos aos tempos de retenção observados nos cromatogramas da quercetina e da rutina, com tempos de retenção de 50,70 min para a quercetina e entre 32,94 e 34,48 min para a rutina. Estes valores são semelhantes aos dos tempos de retenção observados para dois constituintes na fração hidroalcoólica (Figura 20). Estes dados sugerem a presença destes dois flavonóides nesta fração do extrato. Contudo, é importante salientar, que para confirmar a presença destes compostos na fração, seria necessário analisar a amostra utilizando outras técnicas, tais como CLAE-DAD; CLAE-EM-EM.

Muitas espécies do gênero *Eremanthus* já foram relatadas por apresentarem flavonóides em sua composição química, o que corrobora os dados sugeridos pelas análises de CLAE-UV para a amostra analisada (SOARES & FABRI 2011; RIBEIRO, SILVA & CASTRO 2010; VICHNEWSKI *et al.*, 1990; VICHNEWSKI *et al.*, 1989; RAFFAUF *et al.*, 1975; BOHLMANN *et al.*, 1980; LUNARDELLO *et al.*, 1995). Existem estudos que demonstram a presença de compostos como quercetina e rutina em espécies da mesma família ou gênero. Por exemplo, LOBO *et al.*, (2016) avaliaram o extrato acetato de etila das folhas de *Eremanthus crotonoides* e observaram, a presença da quercetina. CRACIUNESCU e colaboradores (2012) avaliaram o teor de flavonóides totais em extratos etanólicos de duas espécies da família Asteraceae (das flores de *Arnica montana* L. e das partes aéreas de *Artemisia absinthium* L.). Nas análises, foi observado um rendimento de $18,44\% \pm 0,76$ e $14,28\% \pm 0,69$ para ambas as espécies, respectivamente. Aqueles autores verificaram que na espécie *A. montana* foi observado alto teor de quercetina e rutina, com valores de 1,881 e 1,186 mg/g de extrato seco, enquanto que a espécie *A. absinthium* apresentou altos teores de quercetina, com valor de 2.707 mg/g de extrato seco.

GESZPRYCH e colaboradores (2011) também avaliaram o extrato metanólico das inflorescências de *Artemisia absinthium* por CLAE-DAD, e identificaram cinco flavonóides (apigenina, diosmetina, orientina, quercetina e hiperosídeo). Por análise em CLAE-DAD, SANTOS (2015b) identificou, altos teores de rutina no extrato bruto e nas frações de acetato de etila e butanólica das partes aéreas de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), com concentrações de 46,39; 229,81 e 23,16 mg/g, respectivamente.

Em estudo anterior do grupo, CUNHA (2016) realizou uma triagem fitoquímica preliminar do extrato etanólico bruto das folhas de *Eremanthus erythropappus*, e observou que os testes para as classes de metabólitos secundários pesquisadas, foram positivos para

flavonóides. RIBEIRO, SILVA & CASTRO (2010) realizaram a triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de três espécies do gênero *Eremanthus*, a *E. erythropappus*, a *E.*

glomerulatus e a *E. incanus*, e também encontraram positividade para pesquisa de flavonoides. Em conjunto, estes dados suportam a hipótese de que as substâncias propostas no presente estudo (quercetina e rutina) sejam os prováveis representantes desta classe de metabolitos secundários, substâncias já relatadas em extratos de plantas deste gênero.

Os resultados observados para as três frações obtidas (hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica), concernentes aos compostos identificados ou propostos, suas classes e métodos de identificação estão sumariados na Tabela 1 do Anexo B.

5.2 Avaliação das Atividades Biológicas

A espécie *Eremanthus erythropappus*, proveniente do bioma Cerrado, do município de Diamantina – Região do Vale do Jequitinhonha foi investigada quanto às atividades antitumoral, tripanocida, leishmanicida, antibacteriana, antifúngica e de citotoxicidade, através da metodologia de microdiluição em placa, que é um método de fácil execução e relativamente econômico (TELLES & MOSCA 2000; SOUZA 2006; VEIGA 2016; SOUZA 2010). Os resultados e discussão para o extrato etanólico bruto e suas frações serão apresentados de acordo com cada atividade biológica avaliada.

5.2.1 Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e suas frações

Para a avaliação da atividade antitumoral do extrato e frações das partes aéreas de *E. erythropappus* foi utilizado a linhagem tumoral MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e a linhagem A549 (adenocarcinoma alveolar humano). Foi detectada uma significativa atividade frente estas células tumorais para todas as amostras testadas (Tabela 8). A eficácia dos extratos foi comparada em relação ao fármaco padrão Paclitaxel (considerado como 100% de eficácia), que apresentou na concentração de 35 µg/mL redução média da viabilidade celular de $83,57 \pm 0,43$ e IC₅₀ de 3,78 µg/mL para a linhagem MDA-MB-231 e redução de $88,28 \pm 2,82$ e IC₅₀ de 6,51 µg/mL para a linhagem A549.

Os resultados obtidos contra a linhagem MDA-MB-231 revelaram que todas as amostras (extrato bruto e frações) apresentaram eficácia máxima superiores ao fármaco padrão paclitaxel,

apresentando valores entre 115,29 e 104,24% para as maiores concentrações testadas. Além disso, tais amostras levaram a uma redução da viabilidade celular superiores ao do fármaco padrão, com valores $\geq 87,12\%$ de morte celular (Tabela 8). Frente à linhagem A549, o extrato tanólico bruto e as frações hexânica e diclorometânica apresentaram eficácias superiores ao paclitaxel (variando de 105,42 a 103,90% para as maiores concentrações testadas), sendo que as amostras levaram a uma redução da viabilidade celular superiores a 91,73%; as IC_{50} variaram de 14,87 a 186,90 $\mu\text{g/mL}$. Já a fase hidroalcoólica não apresentou eficácia superior ao fármaco padrão, porém foi próxima a ele, com eficácia máxima de 96,46% e redução da viabilidade celular de até 85,16%, com IC_{50} de 186,90 $\mu\text{g/mL}$.

Os dados referentes à porcentagem de morte celular, bem como a IC_{50} para o extrato etanólico bruto e suas frações para ambas as linhagens tumorais estão descritos na tabela Tabela 8.

Tabela 8: Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) 1 sobre células das linhagens tumorais MDA-MB-231 e A549.

Atividade Antitumoral						
Planta utilizada	Extrato/Fração	Linhagem Utilizada	Faixa de Concentrações Ativas (Fc) (µg/mL)	% de Morte Celular (Mc)	IC ₅₀ (µg/mL)	Eficácia (E) (%)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (Folhas e Flores)	Extrato etanólico bruto	MDA-MB-231	1000 a 7,81	92,98 a 19,27	47,11	111,26 a 23,05
		A549	1000 a 15,62	91,84 a 19,26	17,74	104,03 a 21,81
	Fração Hexânica	MDA-MB-231	1000 a 15,62	96,35 a 54,85	15,26	115,29 a 65,63
		A549	1000 a 15,62	93,07 a 19,72	37,24	105,42 a 22,33
	Fração Diclorometânica	MDA-MB-231	1000 a 7,81	90,67 a 38,05	15,21	108,49 a 45,53
		A549	1000 a 7,81	91,73 a 40,16	14,87	103,90 a 45,49
	Fração Hidroalcoólica	MDA-MB-231	1000 a 62,5	87,12 a 22,02	164,0	104,24 a 26,34
		A549	1000 a 125	85,16 a 22,33	186,90	96,46 a 25,29

Fc = faixa de concentrações ativas (diferenças significativas em $p < 0,05$, intervalo de confiança de 95% comparada aos respectivos controles negativos ou viabilidades); Mc = redução das viabilidades celulares observadas para a maior e menor concentração ativa do extrato; IC₅₀ = Concentração que inibe 50% das células; E = eficácia observada comparado como respectivos fármacos padrões considerados como 100% de atividade. Os resultados apresentam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata.

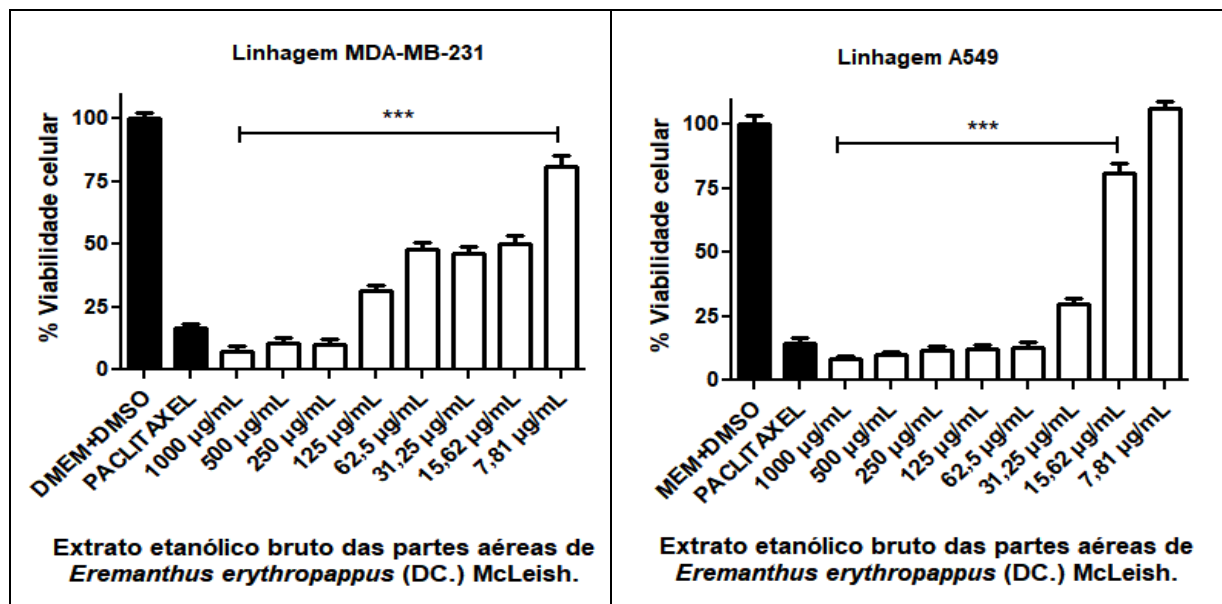
Como uma nova coleta foi realizada e houve a preparação de um novo extrato etanólico bruto das folhas e flores de *E. erythropappus*, este foi inicialmente testado a fim de verificar a manutenção das atividades biológicas previamente observadas. Ele foi ativo frente às duas linhagens de células tumorais. As concentrações ativas para a linhagem MDA-MB-231 foi de 1000 a 7,81 µg/mL, com redução da viabilidade celular variando de 92,98 a 19,27% e IC₅₀ de 47,11 µg/mL (Figura 21; Tabela 8). As três maiores concentrações (1000, 500 e 250 µg/mL) levaram a redução da viabilidade destas células em percentagens superiores ao fármaco padrão e, considerando a eficácia em relação ao paclitaxel (100% de eficácia e percentual médio de morte celular de 83,57%), foi observada eficácia nas três maiores concentrações de 111,26; 107,45 e 107,02%.

Para a linhagem A549, a faixa de concentração com atividade significativa foi de 1000 a 15,62 µg/mL, resultando em redução da viabilidade celular de 91,84 a 19,26% e IC₅₀ de 17,74 µg/mL (Figura 21; Tabela 8). Neste caso é importante destacar, que as concentrações de 1000 até 62,5 µg/mL apresentaram redução da viabilidade das células A549 superiores ao paclitaxel. Em que foram observadas eficácias de 104,03 a 102,37%.

Cunha (2016) em um estudo de triagem de atividades sobre a linhagem MDA-MD-231 já havia apontado o potencial de atividade do extrato das partes aéreas desta planta sobre linhagens tumorais. Contudo, semelhantemente ao observado no presente trabalho também foi observado uma elevada atividade sobre a linhagem MDA-MD-231 (nas concentrações de 1000 a 250 µg/mL), com significativa redução de viabilidade celular, que variou de 97,19 a 97,48% e IC₅₀ de 38,47 µg/mL, corroborando os dados observados no presente estudo.

Desta forma, fica evidenciado que o extrato etanólico bruto de *E. erythropappus* apresentou uma eficácia relativamente boa para ambas as linhagens de células tumorais.

Figura 21: Avaliação da atividade antitumoral do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano), respectivamente.

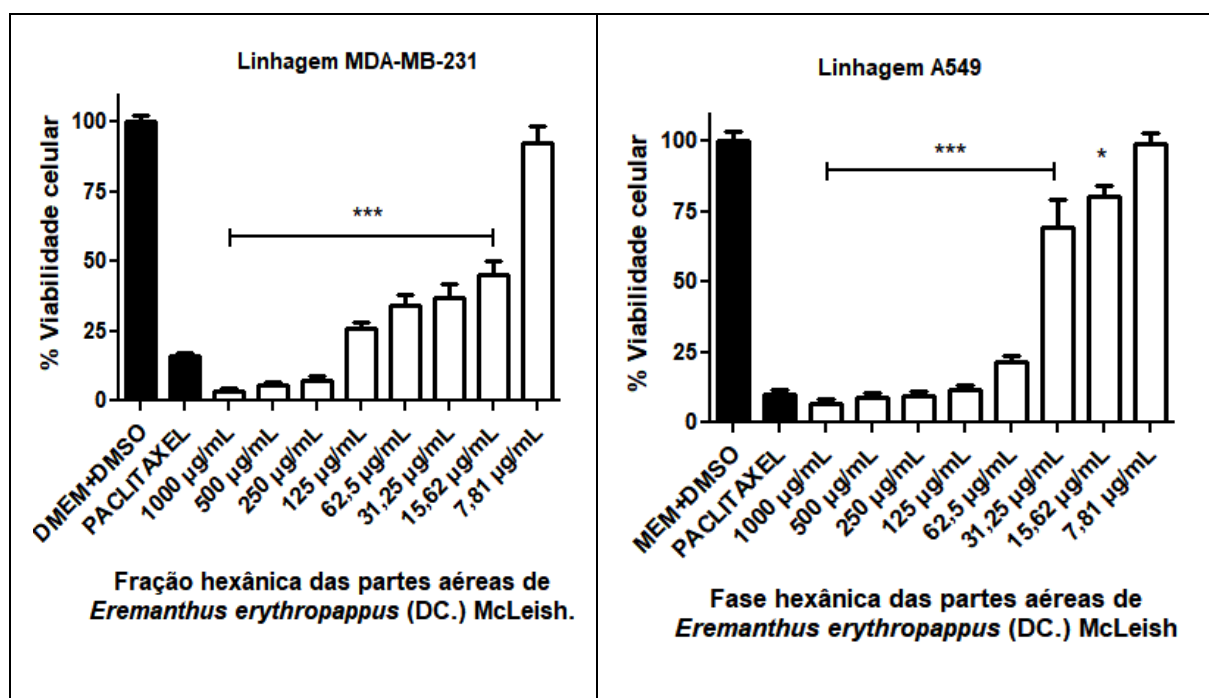


Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (DMEM ou MEM+DMSO). (***) correspondem a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

A fração hexânica se apresentou ativa frente às duas linhagens tumorais, nas três maiores concentrações testadas (1000, 500 e 250 µg/mL) apresentaram redução da viabilidade das células tumorais superiores ao fármaco padrão. As concentrações ativas para a linhagem MDA-MB-231 foi de 1000 a 15,62 µg/mL, apresentando redução da viabilidade celular entre 96,35 a 54,85% e IC_{50} de 15,26 µg/mL. Esta fração apresentou a maior eficácia entre todas as testadas, com valor de eficácia variando de 115,29 a 65,63% para as concentrações com atividade significativa comparada ao controle de viabilidade celular (Figura 22; Tabela 8). Para a linhagem A549 a faixa de concentração ativa foi também de 1000 a 15,62 µg/mL, apresentando redução da viabilidade celular de 93,07 a 19,72% e IC_{50} de 37,24 µg/mL. Quando comparado ao paclitaxel (percentual médio de morte celular de 88,28%) foram observadas eficácias variando de 105,42 a 22,33% (Figura 22; Tabela 8). Foram identificadas em nosso estudo, especificamente na fração hexânica, substâncias pertencentes à classe dos ácidos e dos ésteres de ácidos graxos, que podem ser os responsáveis pela atividade antitumoral observada nesta fração; uma vez que na literatura estão registrados estudos com

espécies vegetais que apresentaram potenciais atividades antitumorais e que também apresentaram em sua constituição química a presença de ácidos graxos, como o ácido palmítico, linolenato e palmitato de etila. Por exemplo, OLIVEIRA (2009) avaliou o extrato hexânico e diclorometânico da espécie *Bostrychia radicans* Montagne (Rhodomelaceae) frente a diferentes linhagens de células tumorais, observando considerável inibição da proliferação das células HL-60 (leucemia) e HCT-8 (côlon). Em outro estudo, ITOH e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antitumoral do ácido linolênico também identificado na fração hexânica em nosso estudo, frente à linhagem de células HuH-7 (carcinoma celular derivada de hepatócitos) e, observaram que esta substância na concentração de 250 μM apresentou redução de 59% da viabilidade celular. SON e colaboradores (2018) avaliaram a atividade antitumoral do linolenato de etila frente a duas linhagens de carcinoma renal (Caki-1 e 786-S). Os autores observaram potencial atividade antitumoral, com IC_{50} de 41 $\mu\text{g/mL}$ e 43 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo esse composto também identificados na fração hexânica do presente estudo.

Figura 22: Avaliação da atividade antitumoral da fração hexânica de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.



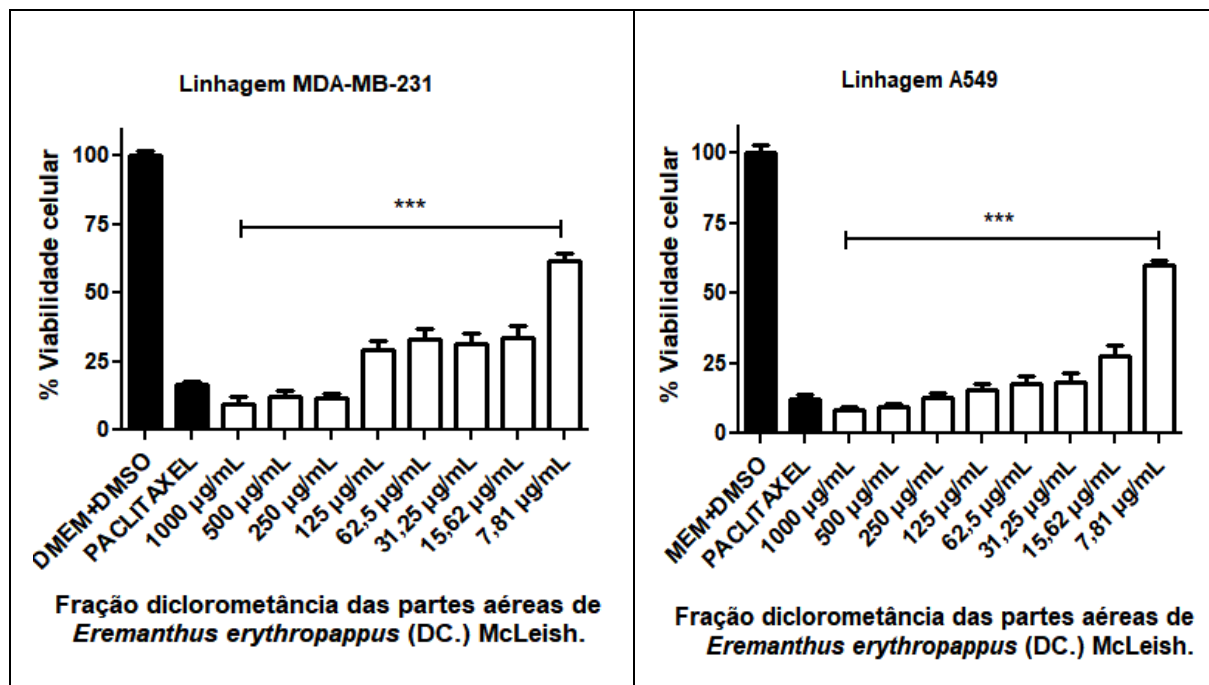
Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle negativo de morte (DMEM ou MEM+DMSO). (*) e (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,05$ e $0,0001$, respectivamente, considerando intervalo de confiança de 95%.

Outra fração avaliada quanto sua atividade antitumoral foi a diclorometânica, que foi significativamente ativa frente à linhagem MDA-MB-231 nas concentrações de 1000 a 7,81 µg/mL, apresentando redução da viabilidade celular entre 90,67 a 38,05% e IC₅₀ de 15,21 µg/mL. As três maiores concentrações testadas apresentaram percentuais na redução da viabilidade desta linhagem e eficácia superiores ao fármaco padrão (Figura 23; Tabela 8).

Em relação à linhagem A549, a fração diclorometânica também apresentou potente atividade antitumoral, que levou a uma redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações testadas (de 1000 a 7,81 µg/mL), sendo que as concentrações de 1000 e 500 µg/mL reduziram a viabilidade celular em percentuais superiores ao paclitaxel (Figura 23; Tabela 8). A IC₅₀ foi de 14,87 µg/mL.

Nesta fração foi verificada a presença da hidroquinona (Tabela 1 – Anexo B). DU e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antitumoral de um análogo da hidroquinona, a (4 - [(tetrahydro-2H-piran-2-yl) oxy]) frente a diferentes linhagens de células tumorais e observaram que esta molécula inibiu significativamente a proliferação das células do carcinoma do cólon murino C26 de forma dose dependente análoga (10, 20, 30 e 40 µg/mL), com redução final de aproximadamente 40% da viabilidade das células. Esses dados sugerem que a atividade antitumoral observada na fração diclorometânica, também deva estar relacionada à presença da hidroquinona, assim como foi observado para o análogo acima.

Figura 23: Avaliação da atividade antitumoral da fração diclorometânica de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (DMEM ou MEM+DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

A última fração avaliada foi à fase hidroalcoólica e, frente à linhagem MDA-MB-231, esta fração mostrou-se ativa nas concentrações de 1000 a 62,5 µg/mL, com valores de redução da viabilidade celular entre 87,12 a 22,02% e IC_{50} de 164,0 µg/mL. Nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg/mL a redução da viabilidade da linhagem MDA-MB-231 foram superiores ao fármaco padrão. Esta fração também apresentou valor de eficácia superior ao fármaco padrão, de 104,24% para a maior concentração testada (Figura 24; Tabela 8). Em relação à linhagem tumoral A549, a fração hidroalcoólica apresentou-se ativa nas quatro maiores concentrações (de 1000 a 125 µg/mL), com redução da viabilidade celular variando de 85,16 a 22,33% e IC_{50} de 186,90 µg/mL. A eficácia para a maior concentração testada foi de 96,46% (Figura 24; Tabela 8).

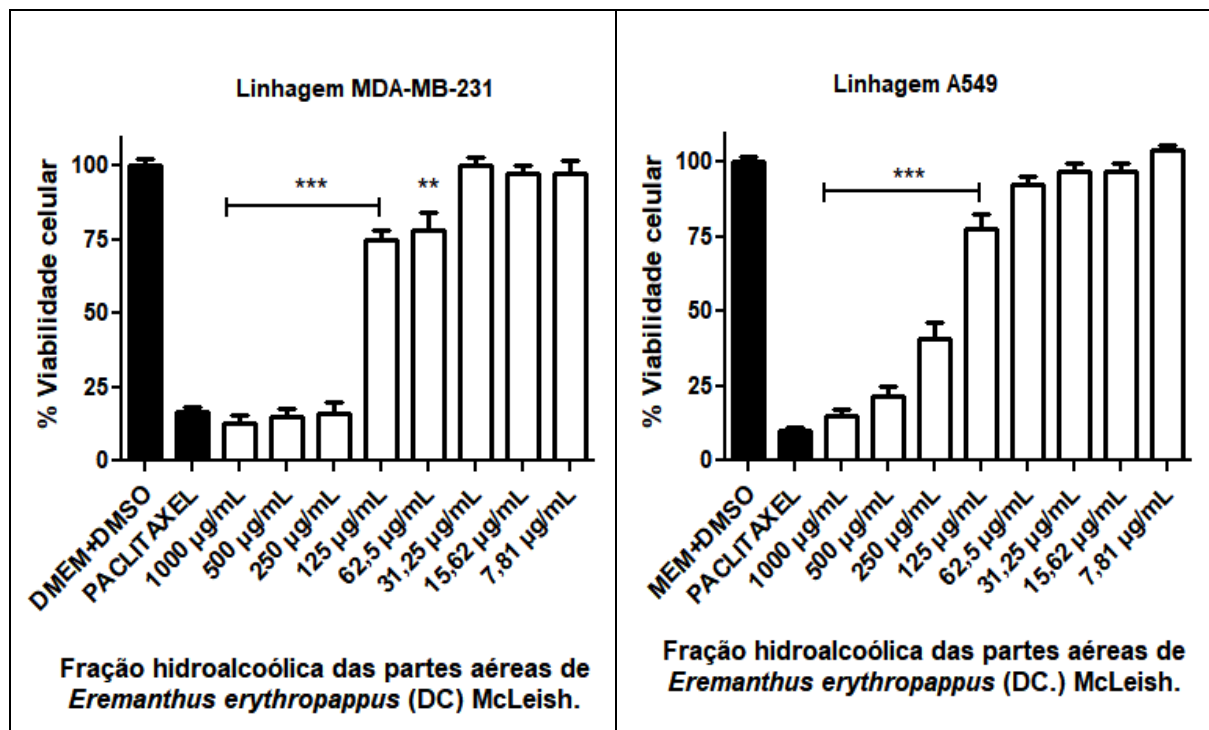
Uma classe de metabólitos secundários que pode estar envolvida na atividade antitumoral é a dos flavonóides, que também foi identificada na amostra hidroalcoólica analisada neste estudo (Tabela 1 – Anexo B). PERSIA e colaboradores (2017) avaliaram o

perfil químico e atividade antitumoral de *Tessaria absinthioides* (Hook. & Arn.) DC, espécie também pertencente à família Asteraceae, frente às linhagens tumorais Hela, Gli-36, HCT-116 e MCF-7. O extrato aquoso das folhas apresentou atividade antitumoral, com valores de IC₅₀ de $3,0 \pm 1,2$; $6,1 \pm 1,1$; $7,6 \pm 1,0$ e $14,8 \pm 1,3$ µg/ml respectivamente. Além disso, a análise fitoquímica desta espécie revelou a presença de diferentes grupos químicos, entre os quais a classe dos flavonóides, que foi o mais abundante, com $76,5 \pm 3,2$ mg/g do extrato seco.

BRITO *et al.*, (2013) avaliaram a atividade do flavonóide quercetina frente a linhagem celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) e verificaram que este metabólito secundário atua reduzindo a proliferação das células cancerígenas, e que esta redução é dependente do tempo, ou seja, a proliferação celular diminui à medida que se aumenta o tempo de incubação com a quercetina, apresentando valores de IC₅₀ de 47,64; 37,67; 32,98 e 30,74 µM nos tempos 24, 48, 72 e 96 hrs respectivamente.

Em outro estudo, MARTINEZ (2016) avaliou a atividade antitumoral da rutina frente células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HT-29) e, observaram efeito anti-proliferativo do flavonóide, com valor de IC₅₀ de 250 µg/ml. Esses dados corroborando que provavelmente, a atividade observada na fração hidroalcóolica das partes aéreas de *E. erythropappus* deve estar associada a presença desses dois metabólitos.

Figura 24: Avaliação da atividade antitumoral da fração hidroalcoólica de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens tumorais MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano) respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (DMEM ou MEM+DMSO). (**) e (***) correspondem as diferenças significativas com $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,0001$ respectivamente, considerando intervalo de confiança de 95%.

Na literatura são descritos inúmeros estudos que demonstram que a espécie *E. erythropappus* apresenta grande quantidade de substâncias, pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários (SILVÉRIO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015a; NASCIMENTO *et al.*, 2007; SOARES & FABRI, 2011) e, tais compostos como o α -bisabolol, substância isolada do óleo essencial desta espécie apresenta atividade antitumoral contra várias linhagens de células tumorais (SEKI *et al.*, 2011; UNO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2010; PIOCHON *et al.*, 2009), corroborando o potencial antitumoral, aqui observado. Contudo, no presente estudo não foi identificado o composto α -bisabolol, que tem sido isolado do óleo essencial desta espécie, diferencialmente do presente trabalho.

Em estudo realizado por LOBO e colaboradores (2012) foi avaliada a atividade antitumoral da fração diclorometânica e etanólica das folhas de *Eremanthus crotonoides* frente às linhagens celulares de cancro de glioblastoma humano U251 e U87. A fração

diclorometânica apresentou-se ativa com IC₅₀ de 19,56 e 16,25 µg/mL frente às linhagens U251 e U87 respectivamente; e a fração etanólica frente U251 e U87, com IC₅₀ de 61,06 e 46,14 µg/mL, respectivamente. Esses dados mostram que frações semelhantes às testadas neste estudo, provenientes de espécies do gênero *Eremanthus*, apresentaram atividades frente células tumorais. Isso se deve provavelmente, pelo fato de que tais espécies pertencem ao mesmo gênero e família e, como foram utilizados solventes extrativos semelhantes ao do presente estudo, ambas as frações diclorometânica e etanólica podem apresentar constituintes químicos semelhantes, responsáveis pelas atividades antitumorais observadas.

5.2.2 Avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e suas frações

Os testes de avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações foram realizadas utilizando as formas epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, que representa um protótipo de resistência ao benznidazol fármaco padrão, conforme determinado por FILARDI & BRENER (1987). A eficácia dos extratos (bruto e frações) foi comparada em relação ao fármaco padrão benznidazol (considerado como 100% de eficácia), que promoveu uma redução da viabilidade da cepa Colombiana (forma epimastigota) de *T. cruzi* em média de $65,63 \pm 6,65$ para a cepa Colombiana, com IC₅₀ de 82,79 µg/mL.

Tanto o extrato etanólico bruto quanto as frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica das partes aéreas de *E. erythropappus* apresentaram atividade tripanocida com diferentes faixas de concentração significativamente ativas sobre a cepa colombiana e boa eficácia avaliadas comparativamente ao fármaco padrão (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as formas epimastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.

Atividade Tripanocida (Cepa Colombiana)					
Planta utilizada	Extrato/Fração	Faixa de Concentrações Ativas (Fc) (µg/mL)	% de Morte Celular (Mc)	IC ₅₀ (µg/mL)	Eficácia (E) (%)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (Folhas e Flores)	Extrato bruto etanólico	1000 a 250	89,75 a 66,47	213,8	136,75 a 101,27
	Fração Hexânica	1000 a 15,62	93,45 a 15,11	125,7	142,38 a 23,02
	Fração Diclorometânica	1000 a 31,25	94,64 a 34,84	97,35	144,20 a 53,08
	Fração Hidroalcoólica	1000 a 250	95,33 a 61,32	228,2	145,25 a 93,43

Fc = faixa de concentrações ativas (diferenças significativas em $p < 0,05$ intervalo de confiança de 95% comparada aos respectivos controles negativos ou de viabilidades celulares); Mc = redução das viabilidades celulares observadas para a maior e menor concentração ativa do extrato; IC₅₀ = Concentração que inibe 50% das formas epimastigotas; E = eficácia máxima observada comparada com o benzonidazol, considerado como 100% de atividade. Os resultados apresentam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Após a obtenção do extrato etanólico bruto e sua avaliação quanto à atividade tripanocida foi observado que o mesmo foi significativamente ativo nas três maiores concentrações testadas (1000, 500 e 250 µg/mL), com redução da viabilidade da cepa Colombiana de 89,75 a 66,47% e valor de IC₅₀ de 213,8 µg/mL. A eficácia deste extrato quando comparado ao Benznidazol foi de 136,75% a 101,27%.

CUNHA em 2016 ao realizar a triagem de atividades biológicas de plantas do Cerrado já apontava para o potencial tripanocida do extrato etanólico bruto das folhas de *Eremanthus erythropappus*, mas baixa seletividade de ação. Esses resultados motivaram a seleção da planta para prosseguir os estudos referentes a esta atividade e, uma vez, que nova coleta e preparação de extrato foi realizada esse foi novamente avaliado para confirmação das atividades previamente observadas.

Os dados obtidos corroboram a atividade anti-tripanosoma do extrato bruto demonstrada e também elevada citotoxicidade. Contudo, foram observadas diferenças na CC₅₀ e redução percentual de morte que, como dito anteriormente, podem ser explicadas pelo fato de que uma nova coleta da planta foi realizada e, conseqüentemente um novo extrato foi preparado, podendo ocorrer alterações na presença dos constituintes. Segundo GOBBO-NETO & LOPES (2007), as ações biológicas desempenhadas por extratos e frações podem ser alteradas devido à influência da sazonalidade sobre sua composição química, fator este que dificulta a padronização dos efeitos de uma determinada espécie vegetal.

Em decorrência da promissora atividade, o extrato foi submetido à partição em solventes de diferentes polaridades e as frações também avaliadas.

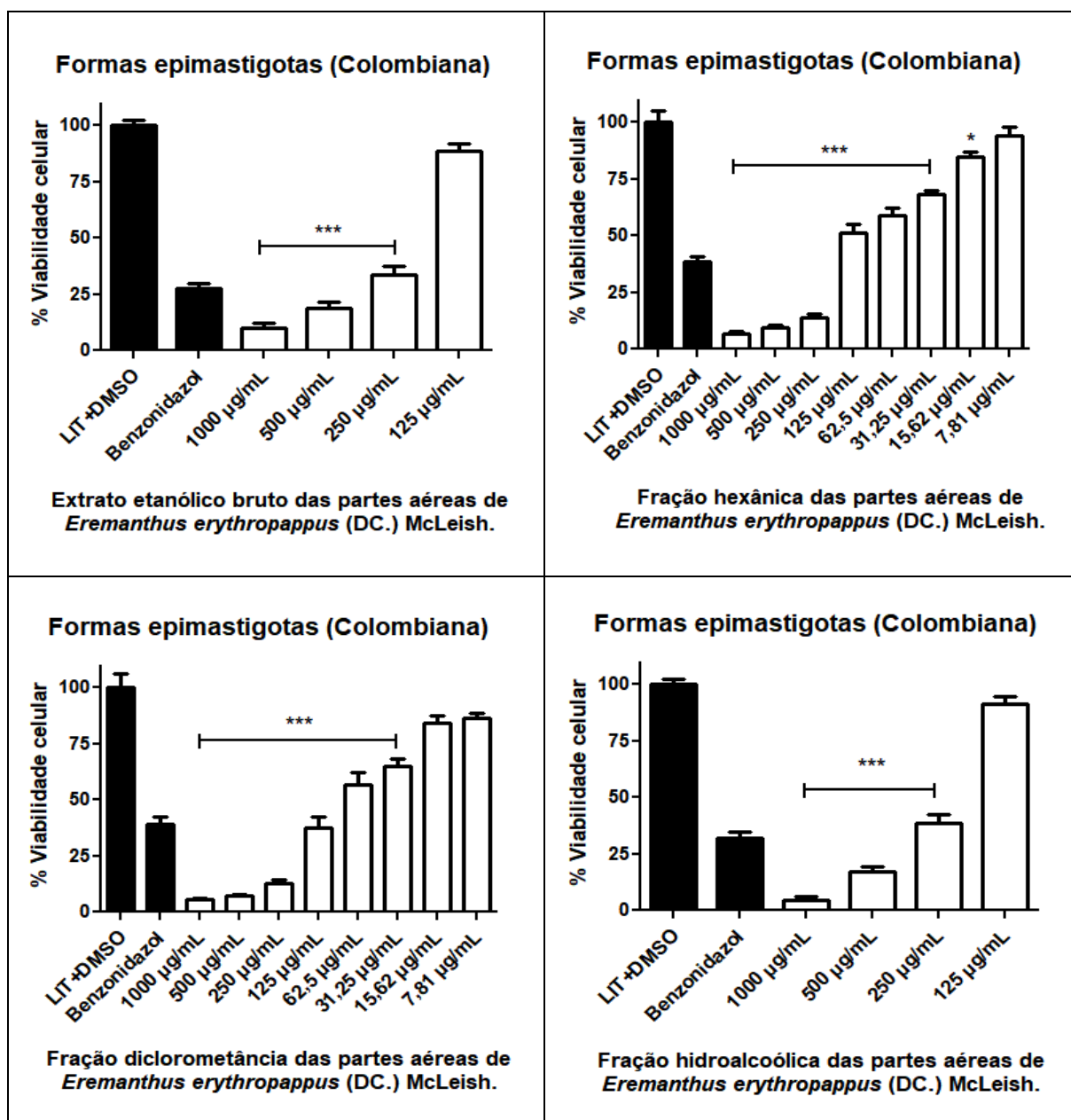
A fração hexânica foi significativamente ativa contra a cepa Colombiana de *T. cruzi* nas concentrações de 1000 a 15,62 µg/mL, levando a uma redução da viabilidade desta cepa de 93,45 a 15,11%, com IC₅₀ de 125,7 µg/mL. A eficácia comparada ao fármaco padrão (média percentual de morte parasitária de 65,63%) foi de 142,38 a 23,02% na faixa de concentração ativa (Figura 25; Tabela 9). Na fração hexânica foi observada a substância fitol, pertencente à classe dos terpenoides. Alguns estudos demonstraram atividade tripanocida de plantas pertencentes à família Asteraceae (*Aristeguietia glutinosa* (Lam.) R.M.) em que foi detectada a presença de terpenoides (VARELA *et al.*, 2014). BERO e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antitripanossômica do composto fitol, isolado do óleo essencial das folhas de *Keetia leucantha* (K. Krause) frente às formas tripomastigotas (cepa Lister 427) de *Trypanosoma brucei brucei* e, observaram potente ação desta molécula, com IC₅₀ de 19,1 ± 2,3 µM, demonstrando que a provável ação tripanocida da fração hexânica deva estar relacionada a presença desta substância.

Nesta fração foram também identificadas substâncias da classe de ácidos e ésteres de ácidos graxos (como ácido palmítico, ácido linolênico, linolenato de etil e palmitato de etila), que também podem estar atuando na atividade tripanocida da espécie *E. erythropappus*. Plantas que apresentaram em sua constituição química a presença de ácidos graxos já demonstraram potencial atividade tripanocida (JIMÉNEZ-COELLO *et al.*, 2013; OLIVEIRA 2009).

A fração diclorometânica mostrou-se ativa nas concentrações de 1000 a 31,25 µg/mL, com redução da viabilidade parasitária entre 94,64 e 34,84%, apresentando IC₅₀ de 97,35 µg/mL. Em relação à eficácia, esta fração apresentou valores variando 144,20 a 53,08%.

A avaliação da fração hidroalcoólica de *E. erythropappus* mostrou atividade tripanocida nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg/mL. A redução da viabilidade celular foi à melhor entre as frações avaliadas e variou de 95,33 a 61,32%. A eficácia variou de 145,25 a 93,43% na faixa de concentração ativa e apresentando IC₅₀ de 228,2 µg/mL (Figura 25; Tabela 9).

Figura 25: Avaliação da atividade tripanocida do extrato etanólico bruto e suas frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as formas epimastigotas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (LIT + DMSO). (*) e (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,0001$, respectivamente, considerando intervalo de confiança de 95%.

Na fração hidroalcoólica das partes aéreas da *E. erythropappus* foi identificada a presença da quercetina, pertencente a classe dos flavonóides e, que pode estar atuando na atividade tripanocida observada. SKAF e colaboradores (2018) avaliaram a atividade de dois flavonóides provenientes do extrato diclorometânico das partes aéreas de *Achillea fragrantissima* Forssk. (Asteraceae) frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei*. Foi observado que as substâncias Chrysosplenol-D e Chrysosplenetine apresentaram potencial atividade tripanocida com IC₅₀ de 30,35 ± 0,23 e 47,27 ± 0,39 µM, respectivamente. Em outro estudo, MAMANI-MATSUDA *et al.*, (2004) avaliaram a atividade tripanocida do flavonóide quercetina frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei gambiense*, a adição deste composto em culturas de *T. b. gambiense* por um período de 24h resultou em uma destruição dos parasitos, que foi dependente da dose, apresentando ainda uma pequena IC₅₀ de 10 µM. TASDEMIR *et al.*, (2006) mostrou a atividade tripanocida da rutina frente às formas tripomastigotas de *T. brucei rhodesiense*, o qual este composto apresentou uma IC₅₀ de 42,1 µg/mL.

Diante dos resultados observados em nosso estudo, e da comprovação da atividade tripanocida para plantas da mesma espécie ou família observada na literatura, podemos destacar o real potencial desta planta na atividade anti-tripanosossoma, uma vez que tanto o extrato etanólico bruto, quanto suas frações foram consideravelmente ativas contra as formas epimastigotas do parasito. Assim, o objetivo do estudo era também avaliar a atividade frente às formas amastigotas (intracelulares) deste parasito. Contudo, o ensaio ficou inviabilizado, uma vez que, todos os extratos e frações avaliados foram também consideravelmente citotóxicos para as células L929 (item 5.2.6) nas faixas de concentração significativamente ativas contra o parasito. Além disso, as formas amastigotas de *T. cruzi* são muito eficientes em escapar de defesas extracelulares, devido sua multiplicação ocorrer no interior das células hospedeiras, tornando-as mais resistentes (SANTILIANO & ALMEIDA 2012). Logo, não seria viável testar concentrações dos extratos que fossem menos tóxicas as células L929, uma vez que estas concentrações não se mostraram ativas frente às formas epimastigotas do parasito. Consequentemente, posteriores análises com os compostos isolados desta planta seria de grande interesse, principalmente os provenientes da fração hidroalcoólica, que apresentaram melhor atividade.

5.2.3 Avaliação da atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto e suas frações

A avaliação da atividade leishmanicida dos extratos e frações foram realizadas utilizando as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHO/BR/73/M2269 como modelo de Leishmaniose Tegumentar), e as formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/74/PP75 como modelo de Leishmaniose Visceral). O extrato etanólico bruto e, suas respectivas frações apresentaram atividade significativa para ambas as cepas de *Leishmania* (Tabela 10). A eficácia dos extratos foi comparada em relação ao fármaco padrão anfotericina B (considerada como 100% de eficácia), que levou a uma redução média da viabilidade parasitária de $82,50 \pm 0,53$ e IC_{50} de $1,79 \mu\text{g/mL}$ para a cepa M2269, utilizada na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. Para a cepa PP75, essa redução foi de $82,85 \pm 5,58$, com IC_{50} de $1,13 \mu\text{g/mL}$.

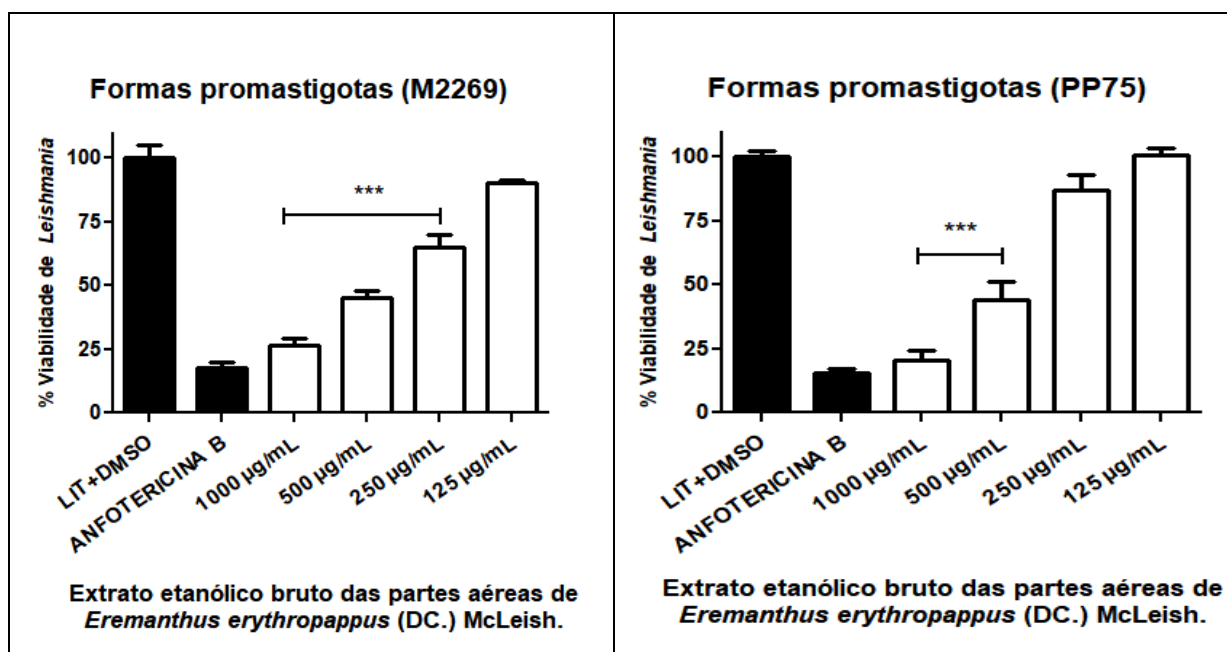
Tabela 10: Avaliação da atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* e da cepa PP75 de *Leishmania infantum*.

Atividade Leishmanicida						
Planta utilizada	Extrato/Fração	Linhagem Utilizada	Faixa de Concentrações Ativas (Fc) (µg/mL)	% de Morte Celular (Mc)	IC ₅₀ (µg/mL)	Eficácia (E) (%)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (Folhas e Flores)	Extrato bruto etanólico	M2269	1000 a 250	73,7 a 34,95	360,8	89,33 a 42,36
		PP75	1000 e 500	79,41 a 56,0	403,4	95,84 a 67,59
	Fração Hexânica	M2269	1000 a 31,25	89,79 a 30,05	29,38	108,8 a 36,42
		PP75	1000 a 62,5	81,47 a 51,88	60,68	98,33 a 62,61
	Fração Diclorometânica	M2269	1000 a 31,25	90,28 a 53,67	30,49	109,43 a 65,05
		PP75	1000 a 31,25	89,21 a 46,26	31,20	107,67 a 55,83
	Fração Hidroalcoólica	M2269	1000 a 250	91,62 a 53,94	232,6	111,05 a 65,38
		PP75	1000 a 250	88,95 a 63,92	214,2	107,36 a 77,15

Fc = faixa de concentrações ativas (diferenças significativas em $p < 0,05$, intervalo de confiança de 95% comparada aos respectivos controles negativos ou viabilidades); Mc = redução das viabilidades celulares observadas para a maior e menor concentração ativa do extrato; IC₅₀ = Concentração que inibe 50% das células; E = eficácia observada comparado como respectivos fármacos padrões considerados como 100% de atividade. Os resultados apresentam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A comprovação da atividade leishmanicida observada previamente por Cunha (2016) foi inicialmente realizada para o extrato etanólico bruto das folhas e flores de *E. erythropappus*. Este apresentou-se ativo frente as duas cepas de *leishmania* avaliadas (M2269 e PP75) sendo as concentrações significativamente ativas para a cepa M2269 de 1000 a 250 $\mu\text{g/mL}$, com redução da viabilidade parasitária entre 73,7 e 34,95% e IC_{50} de 360,8 $\mu\text{g/mL}$. Este apresentou eficácia variando 89,33 a 42,36%. Para a cepa PP75 a faixa de concentração com atividade foi de 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$, com redução da viabilidade parasitária de 79,41% e 56,0% respectivamente, IC_{50} de 403,4 $\mu\text{g/mL}$, e com eficácia comparada a anfotericina B (média percentual de morte parasitária de 82,85%), de 95,84% e 67,59%, respectivamente (Figura 26; Tabela 10). O extrato etanólico bruto apresentou boa eficácia para ambas as cepas, desta forma que as frações obtidas também foram avaliadas.

Figura 26: Avaliação da atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* e da cepa PP75 de *Leishmania infantum*, respectivamente.

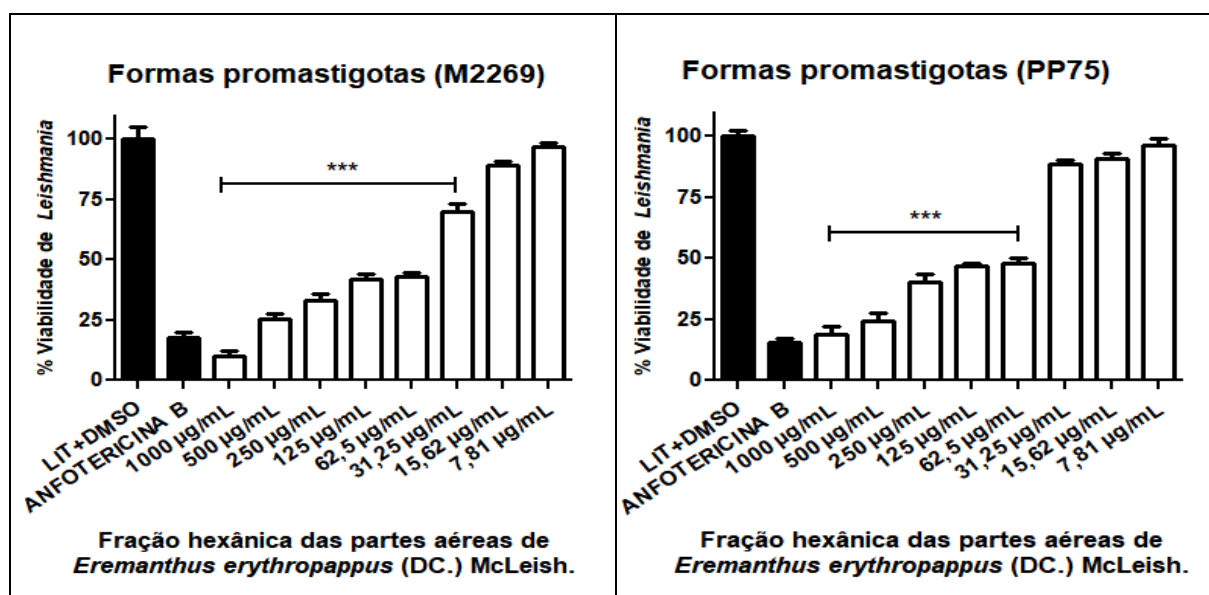


Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (LIT + DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

Após fracionamento, foi avaliada a fração hexânica, que apresentou concentrações ativas frente à cepa M2269 na faixa de 1000 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$, com redução da viabilidade

parasitária entre 89,79 a 30,05% e IC_{50} de 29,38 $\mu\text{g/mL}$. Esta apresentou eficácia variando de 108,8 a 36,42% comparada a Anfotericina B. A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução da viabilidade desta cepa superior ao fármaco padrão (anfotericina B). Para a cepa PP75 a faixa de concentração com atividade significativa foi de 1000 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$, com redução da viabilidade parasitária variando de 81,47 a 51,88%, IC_{50} de 60,68 $\mu\text{g/mL}$, com eficácia entre 98,33 a 62,61% para a faixa de concentração ativa (Figura 27; Tabela 10). OLIVEIRA (2009) avaliou a composição química e atividade leishmanicida da espécie vegetal *Bostrychia radicans* Montagne frente às formas promastigotas de *leishmania amazonensis* e, foi observado que a fração hexânica e diclorometânica desta espécie apresentou IC_{50} de 7,9 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente; valores melhores que os obtidos para o controle padrão Anfotericina B (IC_{50} de 304 $\mu\text{g/mL}$). É importante ressaltar ainda, que tanto esta espécie como a espécie *E. erythropappus*, apresentaram em sua análise fitoquímica substâncias como ácido palmítico, linolenato e palmitato de etila, podendo desta forma, tais substâncias pertencente a classe dos ácidos graxos estarem envolvidas na atividade leishmanicida observada.

Figura 27: Avaliação da atividade leishmanicida da fração hexânica de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* e da cepa PP75 de *Leishmania infantum*, respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o

controle de crescimento (LIT + DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

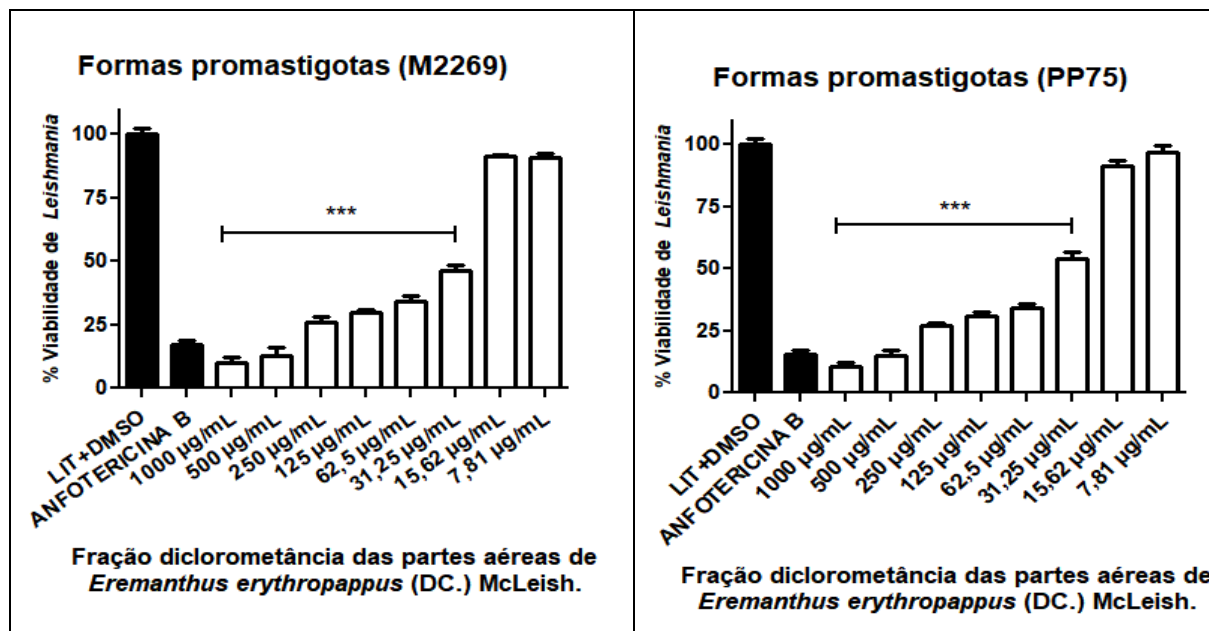
A segunda fração avaliada foi à diclorometânica, que se mostrou ativa frente ambas as cepas de *Leishmania*. As concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram redução da viabilidade parasitária superiores a anfotericina B frente ambas as cepas. A faixa de concentrações significativamente ativas para a cepa M2269 foi de 1000 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$, apresentando-se como o segundo extrato que mais inibiu o crescimento das promastigotas; com redução da viabilidade parasitária entre 90,28 e 53,67% e IC_{50} de 30,49 $\mu\text{g/mL}$. Esta fração também apresentou o segundo melhor valor de eficácia entre os extratos avaliados variando de 109,43 a 65,05% considerando a faixa de concentração ativa.

Em relação à cepa de *Leishmania infantum* (PP75), a faixa de concentração ativa também foi de 1000 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$, apresentando redução da viabilidade parasitária entre 89,21 e 46,26%, IC_{50} de 31,20 $\mu\text{g/mL}$, e eficácia variando de 107,67 a 55,83% quando comparada a anfotericina B (Figura 28; Tabela 10). A fração diclorometânica foi a mais ativa frente à cepa PP75 e a segunda mais ativa frente à cepa M2269.

TOLEDO e colaboradores (2014) também avaliaram o extrato diclorometano das folhas de uma espécie da família Asteraceae, a *Tithonia diversifolia* Hemsl., que apresentou forte atividade leishmanicida *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*, com valor de DL_{50} de $1,5 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$. Nesta fração foi identificada a hidroquinona e, análogos deste composto já são demonstrados por apresentar ação leishmanicida.

VALDERRAMA *et al.*, (2005) avaliou diferentes análogos desta substância e observou promissora atividade contra as formas amastigota de *L. amazonensis*, com IC_{50} variando de 18,7 a 50 μM .

Figura 28: Avaliação da atividade leishmanicida da fração diclorometânica de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* e da cepa PP75 de *Leishmania infantum*, respectivamente.



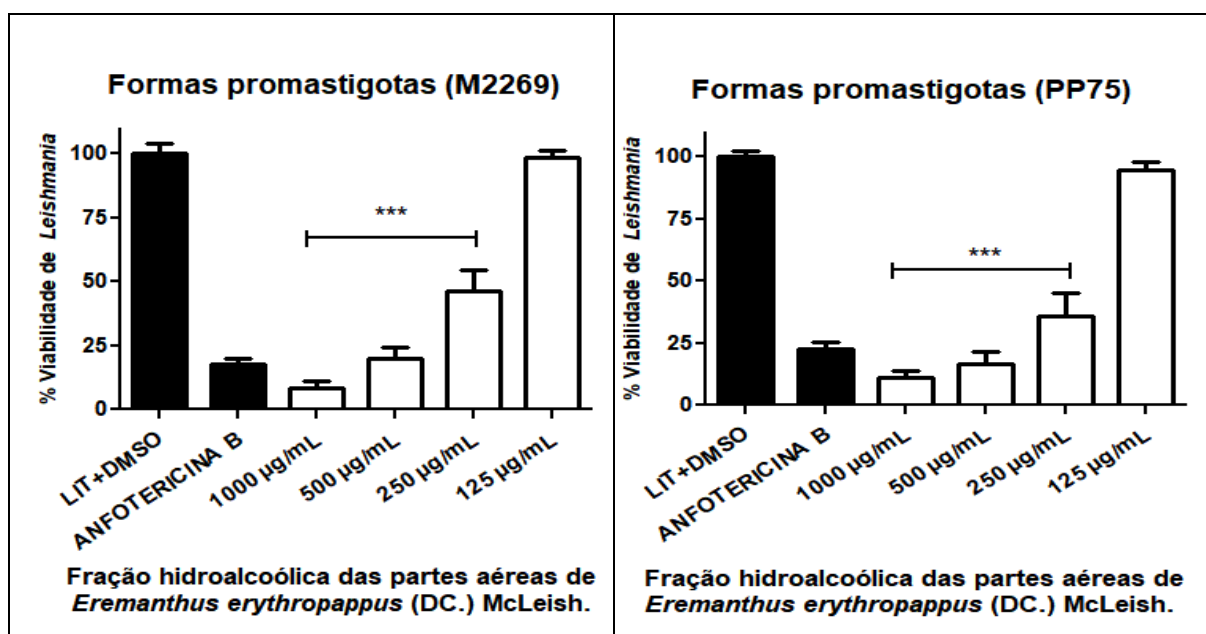
Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (LIT + DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

A fração hidroalcoólica, obtida das partes aéreas de *E. erythropappus*, foi ativa frente à cepa M2269 nas três maiores concentrações (1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$), apresentando-se como o extrato que mais inibiu o crescimento das promastigotas, com valores de redução da viabilidade parasitária entre 91,62 e 53,94% e IC_{50} de 232,6 $\mu\text{g/mL}$. No qual a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução da viabilidade parasitária superior ao fármaco padrão.

Esta fração também apresentou o melhor valor de eficácia entre os extratos avaliados, de 111,05% para a maior concentração testada e de 65,38% para a menor quando comparado a anfotericina B. Em relação à espécie *Leishmania infantum* (cepa PP75) foi ativa na mesma faixa de concentração, apresentando como a segunda fração que mais reduziu a sua viabilidade parasitária (entre 88,95 e 63,92%), IC_{50} de 214,2 $\mu\text{g/mL}$, eficácia de 107,36 a 77,15% (Figura 29; Tabela 10). Frente esta cepa, as concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram redução da viabilidade parasitária superiores a anfotericina B. Nesta fração foram encontrados os flavonóides, quercetina e rutina, que são relatados por apresentarem ação leishmanicida. Por exemplo, MITTRA *et al.*, (2000) avaliaram os flavonóides quercetina, rutina e luteolina isolados das folhas de *Fagopyrum esculentum*

Moench. frente as formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Os autores observaram que a quercetina e a luteolina apresentaram efeito frente os parasitos, com IC₅₀ de 45,5 e 12,5 μ M respectivamente. Em outro estudo, NOVA (2012) avaliou a atividade leishmanicida dos flavonóides quercetina e rutina frente às formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* e, os compostos mostraram uma eficácia dose-dependente contra os parasitos, com uma EC₅₀ de 26 e 30,3 μ g/mL, respectivamente. Além disso, vários estudos relatam a potencial atividade leishmanicida dos flavonóides frente a diferentes espécies de *Leishmania* (BEER *et al.*, 2016; BOECK *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2013). No estudo de MITTRA *et al.*, (2000) a atividade leishmanicida do flavonóide quercetina foi comprovada contra as formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Em conjunto, os dados mostram a fração diclorometânica e hidroalcoólica como as mais promissoras dentre as amostras avaliadas, uma vez que estas frações foram as que mais reduziram a viabilidade das cepas M2269 e PP75, além de apresentar valores de eficácia superiores ao fármaco padrão para ambas as cepas em algumas das concentrações avaliadas.

Figura 29: Avaliação da atividade leishmanicida da fração hidroalcoólica de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish, sobre as formas promastigotas da cepa M2269 de *Leishmania amazonensis* e da cepa PP75 de *Leishmania infantum*, respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (LIT + DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

Como demonstrado acima, foi observada uma significativa atividade dos extratos (bruto e frações) das partes aéreas de *E. erythropappus* frente às formas extracelulares de *Leishmania* (promastigotas), cepa M2269 e PP75 e, posteriormente, tais cepas também seriam utilizadas para infecção dos macrófagos, linhagem RAW 264.7, para obtenção das formas intracelulares do parasito (amastigotas) e posterior ensaio antiamastigota dos extratos. Entretanto, assim como discutido na avaliação da atividade tripanocida, também não foi possível realizar o ensaio frente à forma amastigota de *Leishmania*, uma vez que os extratos também foram consideravelmente citotóxicos quando avaliados frente à linhagem de macrófagos RAW 264.7 (item 5.2.6). Todas as concentrações (de 125 a 0,97 µg/mL) das frações avaliadas ativas frente às formas promastigotas do parasito, também foram muito tóxicas para os macrófagos, inviabilizando a realização dos ensaios. Além disso, a forma amastigota de *Leishmania* é considerada uma forma ainda mais resistente do parasito, uma vez que, dentro do macrófago, estas formas intracelulares inibem diversos mecanismos de defesa (CUNNINGHAM, 2002), sendo desta forma, inviável testar concentrações dos extratos que não foram ativas frente às formas promastigotas em formas amastigotas do parasito.

5.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto e suas frações

No presente estudo, como objetivo de triagem do extrato bruto e suas respectivas frações com potencial atividade antimicrobiana, o extrato bruto e suas frações foram avaliados na faixa de 125 µg/mL a 1000 µg/mL e foram adotados os seguintes critérios para a classificação da atividade dos extratos: aqueles que apresentaram CIM igual ou menor que 250 µg/mL foram considerados como detentores de uma forte atividade antibacteriana, entre $250 < \text{CIM} \leq 500$ µg/mL com atividade moderada; de $500 < \text{CIM} \leq 1000$ µg/mL com fraca atividade e; $\text{CIM} > 1000$ µg/mL sem atividade antibacteriana.

Na literatura existem estudos que demonstram atividade antibacteriana para plantas do mesmo gênero ou família da *E. erythropappus*. Por exemplo, SOUSA e colaboradores (2008b), avaliaram a atividade do óleo essencial das folhas de *Eremanthus erythropappus* pelo método de difusão em ágar contra as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp. Os óleos essenciais das folhas, testadas nas concentrações de 5, 10 e 50 g inibiram o crescimento da

cepa *S. aureus* e da cepa *Salmonella* spp. Dada a relação filogenética entre espécies do mesmo gênero e, que muitas vezes é comum a expressão de substâncias pertencentes às mesmas classes químicas, devido às relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies (MIYAKI *et al.*, 2001). Consequentemente, estes estudos estimularam investigações mais detalhadas sobre a espécie em estudo.

Na tabela 11 estão descritos os resultados obtidos para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* e suas respectivas frações.

Tabela 11: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish frente às cepas bacterianas avaliadas através do método de microdiluição em placa, pelo método colorimétrico da resazurina.

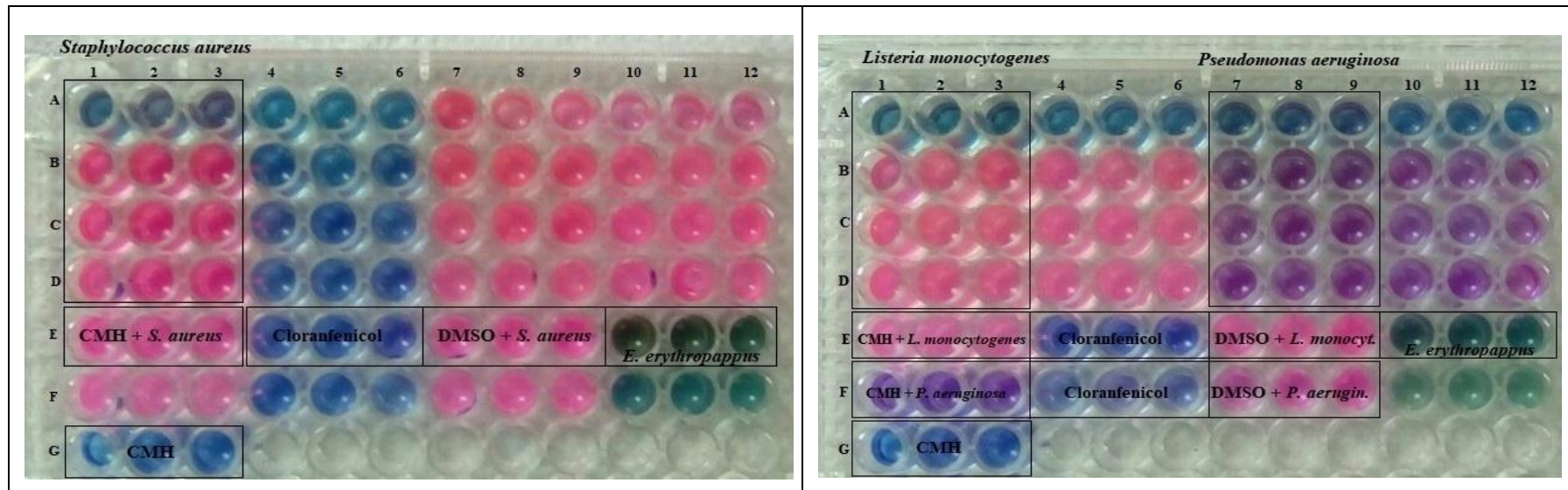
Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)				
Microrganismos	Extrato etanólico bruto	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração hidroalcoólica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1000	1000	> 1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	1000	500	> 1000
<i>Escherichia coli</i>	> 1000	---	---	---
<i>Proteus mirabilis</i>	> 1000	---	---	---
<i>Salmonella typhimurium</i>	> 1000	---	---	---
<i>Klebsiella oxytoca</i>	> 1000	---	---	---
<i>Listeria monocytogenes</i>	1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Bacillus cereus</i>	> 1000	---	---	---

Os resultados representam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata; (---) frações que não foram avaliadas frente aos microorganismos, uma vez que as mesmas só foram avaliadas frente aqueles inibidos pelo extrato etanólico bruto.

O extrato bruto das partes aéreas (folhas e flores) apresentou fraca atividade frente a três bactérias das oito testadas, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM de 1000 µg/mL (Tabela 11).

A figura 30 representa os resultados obtidos para a avaliação da atividade antibacteriana da espécie *Eremanthus erythropappus* (extrato bruto), frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em estudo prévio, CUNHA (2016) avaliou a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto das folhas de *E. erythropappus* frente as cepas *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* observando que este não inibiu nenhuma das cepas avaliadas. Contudo, em nosso estudo foi observada fraca atividade frente às cepas *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e, isto pode ser explicado pelo fato de que além de ter sido realizado uma nova coleta e nova produção do extrato. O autor utilizou apenas as folhas desta espécie, diferencialmente do nosso estudo, em que foram utilizados folhas e flores. Assim o novo extrato pode apresentar diferentes constituintes químicos, que podem estar atuando na atividade observada. SILVÉRIO e colaboradores (2013) avaliaram a atividade do óleo essencial das inflorescências, das folhas secas e frescas, e dos ramos desta espécie frente cepas de bacterias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores observaram que os óleos essenciais foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, mas não apresentaram atividade frente às estirpes *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. É importante salientar, que assim como neste estudo, os extratos e frações também foram ativos frente à cepa *Staphylococcus aureus* e, não inibiram o crescimento de *Escherichia coli*. Contudo, no presente estudo houve atividade antibacteriana frente à *Pseudomonas aeruginosa*. Essas diferenças podem estar associadas a diferenças nas polaridades do extrato, podendo os mesmos apresentar diferentes metabólitos secundários e, conseqüentemente variações na atividade observada.

Figura 30: Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Linhas A, B, C, D: poços teste, contendo concentrações em triplicata de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL do extrato bruto + bactérias; Linhas E e F: poços controle de viabilidade, contendo Caldo Muller Hinton + bactérias; Controle de atividade: Cloranfenicol + bactérias; Dimetilsulfóxido + bactérias; extrato + Caldo Muller Hinton. Por fim na linha G: controle do Caldo Muller Hinton sem bactéria.

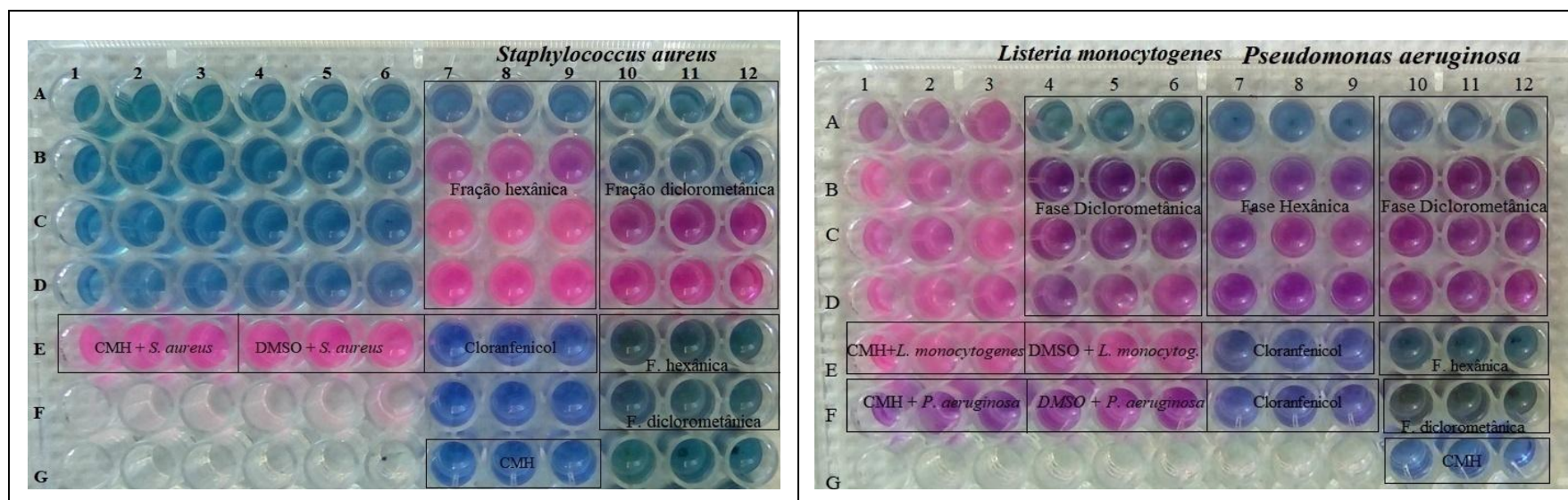
A partir da inibição do crescimento das bactérias testadas contra o extrato bruto, foram selecionadas três espécies (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*) para serem testadas frente às frações. Na literatura, esta espécie carece de atividades antibacterianas com diferentes solventes em diferentes polaridades, uma vez que a maioria das atividades propostas foram realizadas apenas com os óleos essenciais da planta (SOUSA *et al.*, 2008; SILVÉRIO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015a; SALUSTIANO *et al.*, 2006).

Na avaliação da atividade antibacteriana, a fração hexânica foi ativa frente ambas as cepas *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com CIM de 1000 µg/mL (Figura 31; Tabela 11). Foram identificados nesta fração ácidos e ésteres de ácidos graxos (como ácido palmítico, ácido linolênico, linolenato de etil e palmitato de etil (Tabela 1 – Anexo B), e tais classes de ácidos e ésteres de ácidos graxos já são demonstrados na literatura por apresentarem entre outras, ação antibacteriana (SILVEIRA *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2009; ISAACS *et al.*, 1990; ISAACS *et al.*, 1995). Também foram encontrados na fração hexânica terpenoides como o Fitol (Tabela 1 – Anexo B) e, essa classe também já é relatada por apresentar atividades contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (MUNIZ-RAMIREZ *et al.*, 2014; RIVERO-CRUZ *et al.*, 2009; TOR-ANYIIN *et al.*, 2007). Esses dados sugerem que esses compostos podem estar contribuindo isoladamente e/ou sinergicamente para a atividade antibacteriana desta fração.

A fração diclorometânica foi ativa frente às três cepas de bactérias testadas, apresentando atividade antibacteriana moderada frente à bactéria *S. aureus*, com CIM de 500 µg/mL; e fraca atividade antibacteriana para as cepas *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, com CIM de 1000 µg/mL (Figura 31; Tabela 11). Nesta fração foi identificada a presença da hidroquinona. RÚA e colaboradores (2011) avaliaram essa substância frente à cepa *Staphylococcus aureus* e, observaram que este composto fenólico, apresentou potente ação antibacteriana com CIM de 103,05 µg/mL.

A fração hidroalcoólica não inibiu o crescimento de nenhuma das três cepas bacterianas, corroborando dados na literatura. Outros autores avaliaram outras plantas da família Asteraceae e também observaram ausência de atividade das frações hidroalcoólicas frente o crescimento bacteriano de diferentes espécies: *Baccharis microphylla* (MORALES *et al.*, 2008); *Pterocaulon interruptum* DC. (HEEMANN, 2002).

Figura 31: Avaliação da atividade antibacteriana da fração hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Linhas A, B, C, D: poços teste, contendo concentrações em triplicata de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL do extrato bruto + bactérias; Linhas E e F: poços controle de viabilidade, contendo Caldo Muller Hinton + bactérias; Controle de atividade: Cloranfenicol + bactérias; Dimetilsulfóxido + bactérias; extrato + Caldo Muller Hinton. Por fim na linha G: controle do Caldo Muller Hinton sem bactéria.

5.2.4 Avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico bruto e suas frações

Na avaliação da atividade antifúngica, foram adotados os seguintes critérios de avaliação da atividade: extrato bruto e frações com CIM até 250 µg/mL foram classificados como forte atividade antifúngica, entre 250 e 750 µg/mL com atividade moderada; de 750 a 1000 µg/mL com fraca atividade e, >1000 µg/mL sem atividade antifúngica. Vários autores têm demonstrado potencial atividade antifúngica ao avaliarem plantas da família Asteraceae, como a *Senecio heterotrichiu* (FRANCESCATO *et al.*, 2007) e a *Arctiumlappa* L (BALLIANA, 2012) que tem apresentando considerável atividade antifúngica.

O extrato bruto das partes aéreas (folhas e flores) de *E. erythropappus*, apresentou atividade frente às três leveduras avaliadas, com fraca atividade antifúngica para a cepa *C. albicans* com CIM de 1000 µg/mL, atividade moderada para a *C. krusei* com CIM de 500 µg/mL, e uma forte atividade frente a cepa *C. tropicalis*, com CIM de 125 µg/mL (Tabela 12).

Na tabela 12 estão descritos os resultados da avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica.

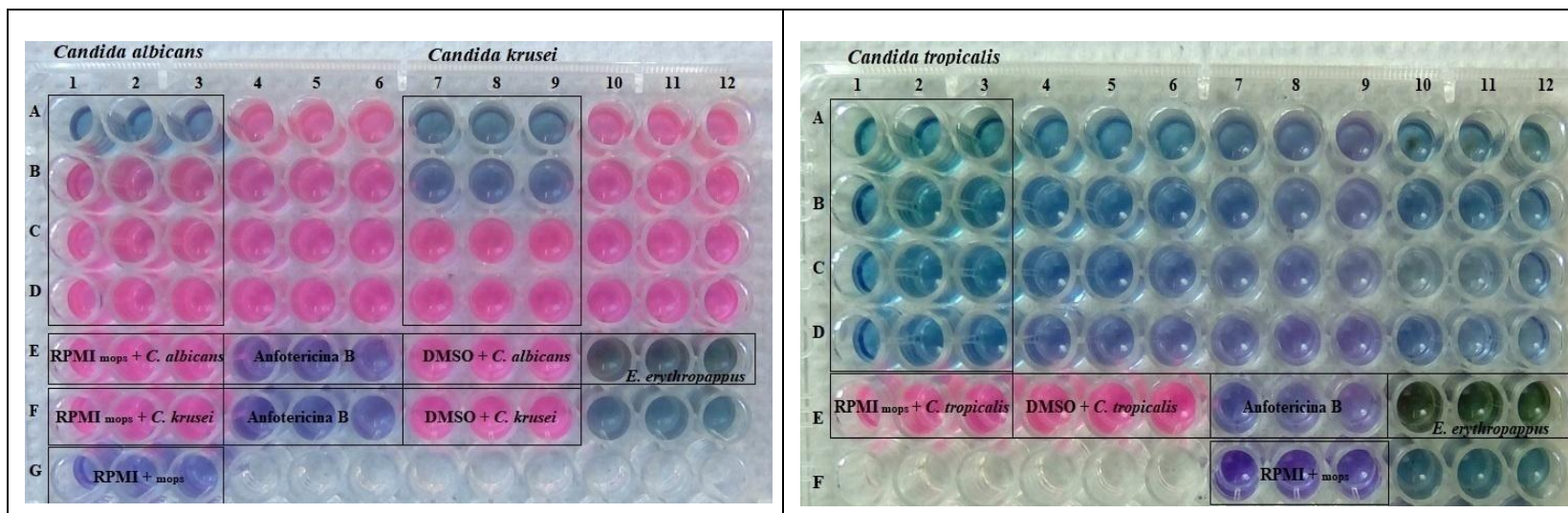
Tabela 12: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico bruto e suas respectivas frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish frente às cepas fúngicas avaliadas através do método de microdiluição em placa, pelo método colorimétrico da resazurina.

Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)				
Microrganismos	Extrato etanólico bruto	Fase hexânica	Fase diclorometânica	Fase hidroalcoólica
<i>Candida albicans</i>	1000	> 1000	250	1000
<i>Candida tropicalis</i>	125	125	250	500
<i>Candida krusei</i>	500	> 1000	500	1000

Os resultados representam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata; (---) frações que não foram avaliadas frente aos micro-organismos, uma vez que as mesmas só foram avaliadas frente aos microorganismos que foram inibidos pelo extrato etanólico bruto.

A figura 32 representa os resultados obtidos para a avaliação da atividade antifúngica da espécie *E. erythropappus* (extrato bruto), frente às cepas *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Os dados mostram que o extrato bruto foi ativo frente às três cepas leveduriformes, corroborando os resultados observados por Cunha (2016). Outros autores também observaram atividade antifúngica associada a *E. erythropappus* (óleos essenciais de folhas e ramos) contra diferentes cepas de fungos (SANTOS *et al.*, 2015a; SOUSA *et al.*, 2008b). A análise dos resultados obtidos com o extrato etanólico bruto permitiu a seleção das três cepas de leveduras (*Candida albicans*, *Candida Krusei* e *Candida tropicalis*), cujo crescimento foi inibido pelo mesmo, para serem testadas também frente às frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica das partes aéreas de *E. erythropappus*..

Figura 32: Avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico bruto sobre *Candida albicans*, *Candida Krusei* e *Candida tropicalis* utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



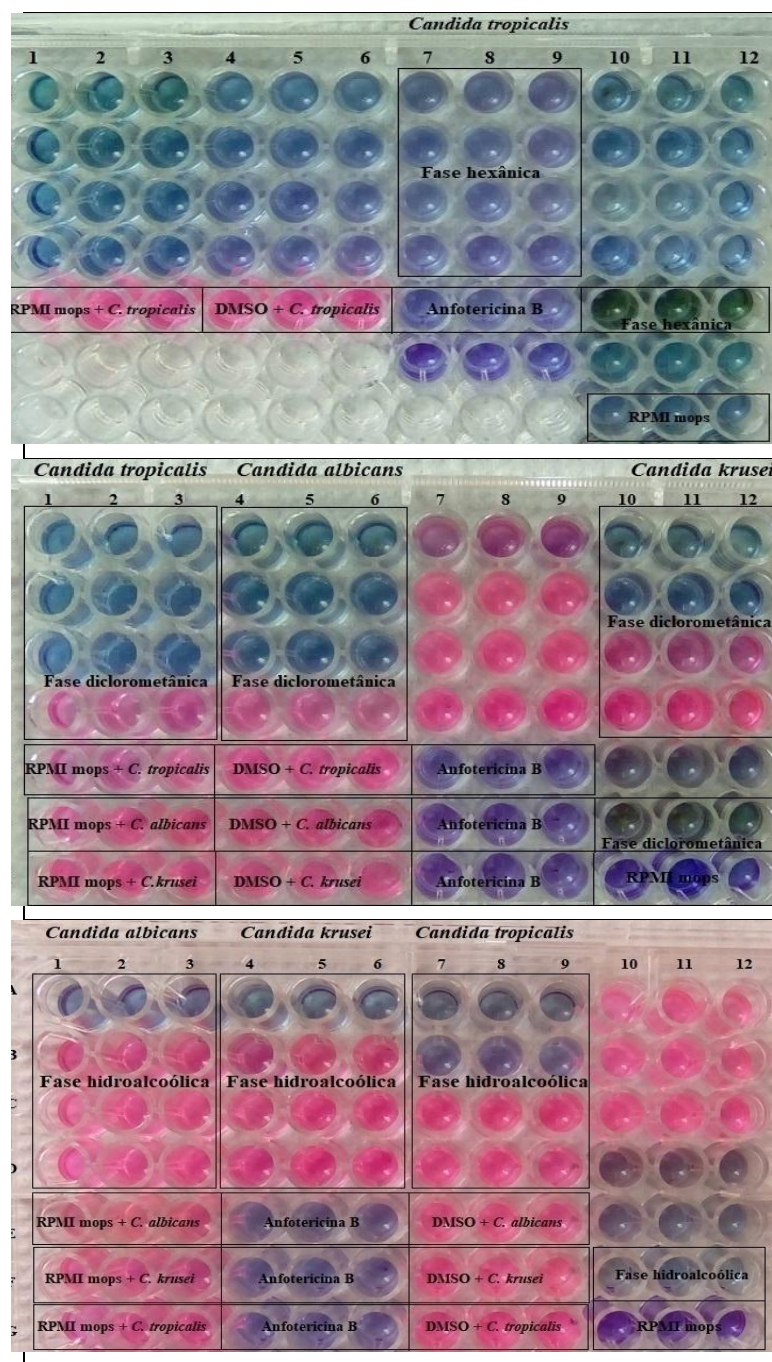
Linhas A, B, C, D: poços teste, contendo concentrações em triplicata de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL do extrato bruto + fungos; Linhas E e F: poços controle de viabilidade, contendo RPMI + fungos; Controle de atividade: Anfotericina B + fungos; Dimetilsulfóxido + fungos; extrato + RPMI. Por fim na linha G: controle do RPMI sem fungo.

A fração hexânica foi ativa frente à levedura *Candida tropicalis*, apresentando forte atividade antifúngica com CIM de 125 µg/mL (Figura 33; Tabela 12). Nesta fração foram identificadas substâncias pertencentes à classe dos ácidos e ésteres de ácidos graxos que já foram associados a atividades antifúngicas (PRIMO *et al.*, 2013; NAGHETINI 2006; SINGH *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2003; SACCHETTI *et al.*, 2005). O ácido palmítico, por exemplo, foi avaliado por PRIMO *et al.*, (2013) frente à cepa *Candida albicans*, com uma CIM de 500 µg/mL para esta molécula. Outra substância identificada nesta fração foi o Fitol, pertencente à classe dos terpenoides e, que pode estar atuando na ação antifúngica, uma vez que esta classe tem também relatada atividade antifúngica (FERREIRA *et al.*, 2009; SCHUCK *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2008).

A fração diclorometânica foi ativa frente às três cepas leveduriformes testadas, com forte atividade antifúngica frente às cepas *C. tropicalis* e *C. albicans* (CIM de 250 µg/mL) e, atividade moderada para a *C. krusei* (CIM de 500 µg/mL) (Figura 33; Tabela 12). Nesta fração foi identificada substância pertencente à classe dos compostos fenólicos e, tal classe já é relatada por apresentar atividade antifúngica (DEL RÍO *et al.*, 2003; RASOOLI e ABYANEH, 2004; OLIVEIRA 2005). A hidroquinona, substância identificada nesta fração, também já é relatada por apresentar ação antifúngica contra as cepas *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis* (SEIBERT *et al.*, 1985) e *Cladosporium sphaerospermum* (BENTO *et al.*, 2013).

Em relação fração hidroalcoólica, a mesma apresentou fraca atividade antifúngica para as cepas *C. albicans* e *krusei* CIM = 1000 µg/mL e, atividade antifúngica moderada frente à cepa *C. tropicalis*, com CIM de 500 µg/mL (Figura 33; Tabela 12). Nesta fração foram identificadas substâncias pertencentes à classe dos flavonóides e, esta classe já é demonstrada por apresentar ação contra diferentes cepas fúngicas (ARIF *et al.*, 2011; SERPA *et al.*, 2012; SALAS *et al.*, 2011; SANDHAR *et al.*, 2011). A quercetina, isolada por SOUZA-MOREIRA *et al.*, (2018) demonstrou ação frente às cepas *Candida krusei* e *Trichophyton rubrum*. A rutina também já foi avaliada frente espécies de fungos e, mostrou-se ativa contra a *Candida krusei* (ORHAN *et al.*, 2010; JOHANN *et al.*, 2011) e *Cryptococcus neoformans* (OLIVEIRA *et al.*, 2016b).

Figura 33: Avaliação da atividade antifúngica das frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica sobre *Candida albicans*, *Candida Krusei* e *Candida tropicalis* utilizando a técnica de microdiluição em microplaca com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Linhas A, B, C, D: poços teste, contendo concentrações em triplicata de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL do extrato bruto + fungos; Linhas E e F: poços controle de viabilidade, contendo RPMI + fungos; Controle de atividade: Anfotericina B + fungos; Dimetilsulfóxido + fungos; extrato + RPMI. Por fim na linha G: controle do RPMI sem fungo.

5.2.6 Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e suas frações

O extrato etanólico bruto, as frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica das partes aéreas de *E. erythropappus* apresentaram diferentes graus de toxicidade sobre as células de mamífero L929 e RAW 264.7. Em relação às células RAW foram avaliadas concentrações a partir de 125 µg/mL, uma vez que os extratos foram consideravelmente citotóxicos e, concentrações menores foram necessárias para cálculo da CC₅₀. Os valores de CC₅₀ para ambas as linhagens variaram de 1,02 a 176,8 µg/mL (tabela 13). Todos os extratos reduziram em mais de 50% da viabilidade celular para as maiores concentrações testadas, sendo que a fase diclorometânica foi a mais tóxica frente às duas linhagens celulares, chegando a reduzir 93,88% da viabilidade dos fibroblastos e 90,71% da viabilidade dos macrófagos. Os demais extratos e frações reduziram a viabilidade das células L929 na faixa de 90,30 a 16,32% e, para as células RAW de 69,24 a 11,58% (Tabela 13). Foram calculados ainda os valores de Índices de Seletividade (IS) para cada extrato e frações (Tabela 14), no qual a citotoxicidade frente às células L929 foi comparada com a atividade frente às células tumorais e parasitárias, a fim de avaliar o quanto este extrato ou fração é ativo frente às células de tumor ou dos parasitos sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos (L929).

Tabela 13: Resultados da avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas da espécie vegetal *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre células L929 e RAW 264.7.

Avaliação da Citotoxicidade					
Planta utilizada	Extrato/Fração	Linhagem Utilizada	Faixa de Concentrações Ativas (Fc) (µg/mL)	% de Morte Celular (Mc)	CC ₅₀ (µg/mL)
<i>Eremanthus erythropappus</i> (Folhas e Flores)	Extrato etanólico bruto	L929	1000 a 7,81	89,03 a 31,43	13,08
		RAW 264.7	125 a 1,95	57,79 a 11,58	3,46
	Fração Hexânica	L929	1000 a 7,81	90,30 a 16,32	15,34
		RAW 264.7	125 a 3,90	62,71 a 14,70	6,27
	Fração Diclorometânica	L929	1000 a 7,81	93,88 a 20,14	29,29
		RAW 264.7	125 a 0,97	90,71 a 29,94	1,02
	Fração Hidroalcoólica	L929	1000 a 125	83,76 a 27,62	176,8
		RAW 264.7	125 a 62,5	69,24 a 24,22	73,55

Fc = faixa de concentrações ativas (diferenças significativas em $p < 0,05$, intervalo de confiança de 95% comparada aos respectivos controles negativos ou viabilidades); Mc = redução das viabilidades celulares observadas para a maior e menor concentração ativa do extrato; CC₅₀ = Concentração que inibe 50% das células. Os resultados apresentam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 14: Valores dos Índices de Seletividade (IS) do extrato etanólico bruto e frações das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish e seus respectivos padrões sobre células tumorais e parasitárias.

Índices de Seletividade (IS)						
Atividade avaliada	Linhagem/Cepa	Extrato etanólico bruto	Fração hexânica	Fração diclorometânica	Fração hidroalcoólica	Fármaco padrão *
Antitumoral	MDA-MB-231	0,27	1,0	1,85	1,07	4,64
	A549	0,73	0,41	1,90	0,94	2,69
Tripanocida	Colombiana	0,06	0,12	0,30	0,77	2,03
Leishmanicida	M2269	0,03	0,52	0,96	0,76	2,20
	PP75	0,03	0,25	0,93	0,82	3,49

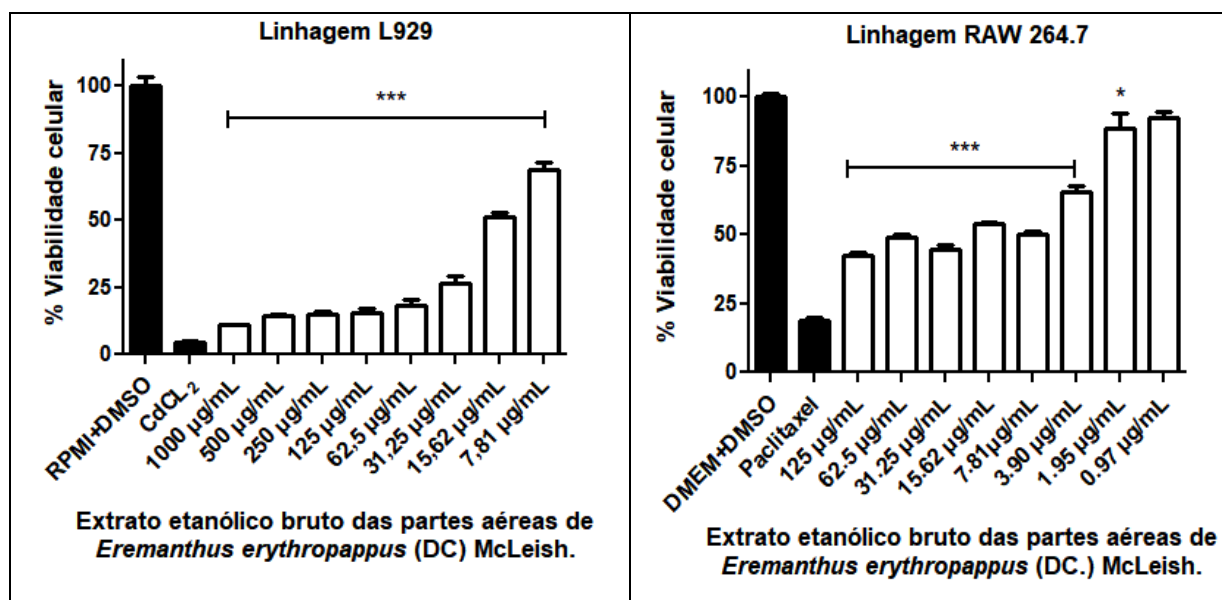
Os resultados apresentam a avaliação de três experimentos independentes realizados em triplicata; *Fármaco padrão correspondente a atividade: Antitumoral: Paclitaxel; Tripanocida: Benzonidazol; Leishmanicida: Anfotericina B.

Entre as amostras estudadas, o extrato etanólico bruto promoveu um percentual de morte celular que variou de 89,03 a 31,43%, com faixa de concentração tóxica de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e CC_{50} de 13,08 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem L929 (Figura 34; Tabela 13). Semelhantemente, em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, CUNHA 2016 avaliou 12 extratos etanólicos brutos de diferentes espécies vegetais nativas do Bioma Cerrado, entre os quais, as folhas de *Eremanthus erythropappus*. A toxicidade foi testada também frente a fibroblastos (L929), sendo observado que o extrato desta espécie apresentou um percentual de morte celular variando de 92,4% a 83,5% (faixa de concentração 1000 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$) e IC_{50} de 50,63 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados foram confirmados pelos resultados obtidos pelo presente estudo. Contudo, foi observada uma diferença no valor da CC_{50} , provavelmente, devido à realização de uma nova coleta da espécie vegetal, seguida de nova extração e obtendo-se um novo extrato bruto. Segundo GOUVEA e colaboradores (2012), vários fatores podem alterar o metabolismo secundário das plantas, entre eles: temperatura, radiação UV, altitude e chuva; levando a alterações nas proporções relativas de metabólitos secundários entre espécimes coletados em diferentes épocas.

Frente à linhagem RAW 264.7, o extrato etanólico bruto apresentou faixa de concentração significativamente ativa de 125 a 1,95 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} de 3,46 e percentual de morte celular variando de 57,79 a 11,58% (Figura 34; Tabela 13).

O extrato etanólico bruto foi pouco seletivo frente às células tumorais e parasitárias, apresentando baixos IS, variando de 0,03 a 0,73 (Tabela 14), o que limitaria sua aplicação terapêutica. Contudo, considerando que o extrato bruto é uma mistura de substâncias, cujos efeitos tóxicos poderiam se somar, esses resultados estimularam o prosseguimento dos estudos deste trabalho, a fim de melhorar o perfil de atividade por meio do fracionamento e/ou isolamento da(s) substância(s) com ação antitumoral e antiparasitária, tentando reduzir assim sua citotoxicidade. Os resultados obtidos para as frações são descritos a seguir.

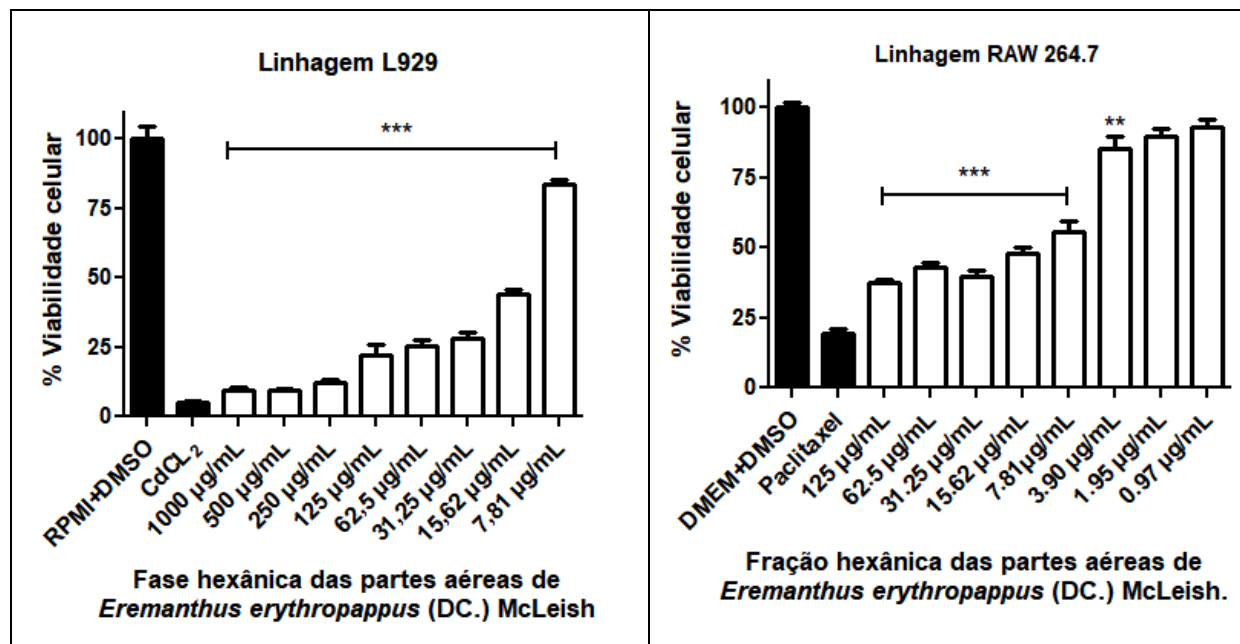
Figura 34: Avaliação da citotoxicidade do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (RPMI ou MEM+DMSO). (***) e (*) correspondem as diferenças significativas com $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,0001$, respectivamente, considerando intervalo de confiança de 95%.

A fração hexânica também foi significativamente tóxica para as L929, na faixa de concentração de 1000 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$, com percentual de morte celular variando de 90,3 a 16,32% e CC_{50} de 15,34 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35; Tabela 13). Frente os macrófagos RAW 264.7, esta fração apresentou faixa de concentração significativamente ativa de 125 a 3,90 $\mu\text{g/mL}$, com percentual de morte celular variando entre 62,71 a 14,70% e CC_{50} de 6,27 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35; Tabela 13). A fração hexânica também apresentou valores de IS insatisfatórios, variando de 0,12 a 1,0 (Tabela 14), demonstrando falta de seletividade frente às células tumorais e parasitárias, uma vez que deveriam apresentar um IS de pelo menos 2,0. Esses valores são desejáveis, uma vez sugerem que a amostra teste seria pelo menos duas vezes mais ativo frente às células tumorais ou parasitas, conseqüentemente, menor efeito ela teria sobre as células normais. Contudo, mesmo diante da toxicidade observada para esta fração, foram identificados compostos como o palmitato de etila, o ácido linolênico e o linolenato de etila, e tais substâncias carecem de estudos frente atividades tripanocidas e leishmanicidas, além disso, isoladas poderiam manter-se ativas como na fração, além de apresentar menor toxicidade às células L929.

Figura 35: Avaliação da citotoxicidade da fração hexânica das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (RPMI ou MEM+DMSO). (***) e (**) correspondem as diferenças significativas com $p \leq 0,0001$ e $p \leq 0,01$, respectivamente, considerando intervalo de confiança de 95%.

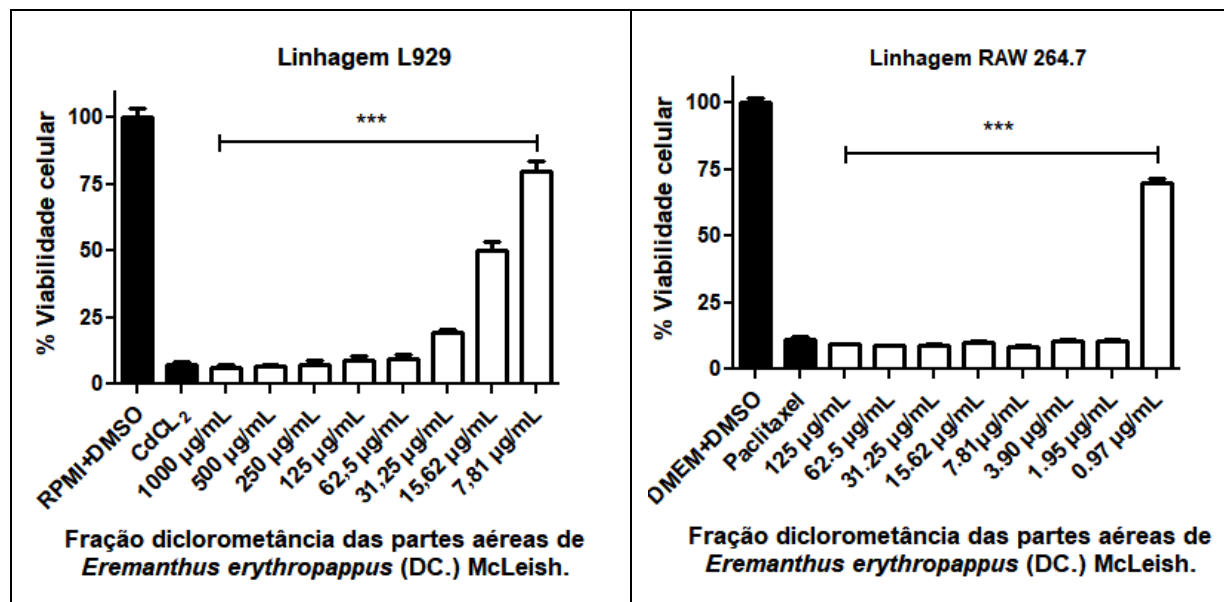
A fração diclorometânica apresentou toxicidade para as L929 em todas as concentrações testadas, sendo a fração que mais reduziu a viabilidade destas células, com percentual de morte celular variando de 93,88 a 20,14% e CC_{50} de 29,29 µg/mL (Figura 36; Tabela 13). Frente à linhagem RAW 264.7, esta fração reduziu a viabilidade das células, sendo registrados percentuais de morte celular variando de 90,71 a 29,94% na faixa de concentrações significativamente ativas de 125 a 0,97 µg/mL e com CC_{50} de 1,02 (Figura 36; Tabela 13). Esta fração demonstrou valores de IS variando de 0,30 a 1,90 (Tabela 14), demonstrando toxicidade as células L929. Porém, a de se considerar que esta fração foi a mais promissora, frente às duas linhagens testadas. Ela apresentou IS de 1,85 frente à linhagem A549 e 1,90 frente à linhagem MDA-MB-231 (Tabela 14). Esses dados sugerem que apesar da citotoxicidade observada para a fração diclorometânica, ela pode ser promissora para prosseguimento dos estudos de atividade antitumoral, uma vez que o próprio fármaco padrão (paclitaxel) apresentou valores de IS de apenas 2,69 frente à linhagem A549, sendo neste caso

uma substância pura. A baixa seletividade celular e, conseqüentemente, os efeitos citotóxicos, em geral, são características dos fármacos antitumorais. O próprio Paclitaxel é um bom exemplo, uma vez que, embora ele seja um fármaco clinicamente muito ativo, o mesmo apresenta inúmeros problemas clínicos que acarretam a sua toxicidade, entre eles, a baixa solubilidade do fármaco, o ajuste da dose e os solventes utilizados para a diluição dos mesmos (YARED & TKACZUK 2012). Em estudo realizado por RODRIGUES e colaboradores (2002), foi realizado o ensaio de toxicidade aguda *in vivo* em ratos Wistar do paclitaxel comercial e de uma formulação de paclitaxel incorporada à emulsão de colesterol (LDE) e, observaram que quando administradas doses de ambas as drogas, foi notado que o paclitaxel comercial apresentou uma maior toxicidade quando comparada ao paclitaxel-LDE, com DL_{50} de 31,8 mg/kg e 324 mg/kg respectivamente.

Outro fármaco antitumoral bastante conhecido pela sua toxicidade é a Cisplatina, principalmente, apresentando como principal problema a nefrotoxicidade. LEITE (2010) avaliou a toxicidade aguda *in vivo* em camundongos Swiss da cisplatina livre e incorporada a lipossomas, nos quais a administração da cisplatina livre na dose de 10 mg/kg induziu alta mortalidade (60%) dos camundongos, enquanto que, os camundongos tratados com cisplatina incorporada a lipossomas em dose similar (12 mg/kg) não acarretou em nenhuma morte. Além disso, reações como diarreia, ataxia e fraqueza também foram observadas em todos os camundongos que foram administrados com cisplatina livre, em contrapartida não foi observado para a forma lipossomal. Mostrando que substâncias carregadas em nanotransportadores podem apresentar menores efeitos citotóxicos às células, sendo assim uma forma de contornar toxicidade de compostos isolados.

Semelhantemente, SOARES & FABRI (2011) avaliaram a atividade citotóxica do extrato diclorometânico das folhas da espécie *Eremanthus erythropappus* frente a Larvas de *Artemia salina* (náuplios) e observaram que esta fração apresentou potente efeito tóxico sobre as larvas, com uma CL_{50} de 64,7 µg/mL, corroborando os resultados observados no presente estudo para esta espécie. Nesta fração foi identificada a substância hidroquinona e, esta já é demonstrada por apresentar citotoxicidade frente células de mamífero. POIRIER *et al.*, (2002) também mostraram efeito consideravelmente tóxico desta substância frente à proliferação de linfócitos T e B.

Figura 36: Avaliação da citotoxicidade da fração diclorometânica das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.

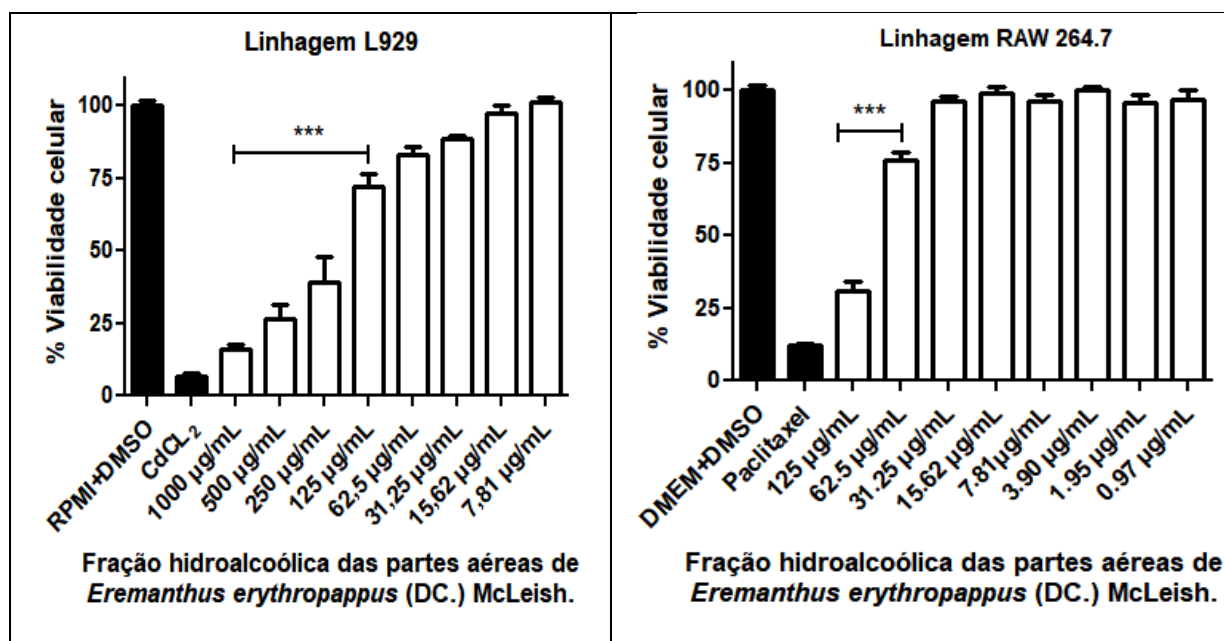


Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (RPMI ou MEM+DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

A avaliação da citotoxicidade da fração hidroalcoólica frente à linhagem L929 apresentou faixa de concentração citotóxica de 1000 a 125 $\mu\text{g/mL}$, percentual de morte celular variando de 83,76 a 27,62% e CC_{50} de 176,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 37; Tabela 13). Para a linhagem RAW 264.7 a faixa de concentração ativa foi de 125 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$, com percentuais de morte de 69,24 a 24,22% e CC_{50} de 73,55 (Figura 37; Tabela 13). Os valores de IS para esta fração variaram de 0,76 a 1,07 (Tabela 14), demonstrando, assim como os demais extratos, que a fração hidroalcoólica também se apresentou bastante citotóxica para os fibroblastos de mamíferos, levando a valores de IS insatisfatórios. O gênero *Eremanthus* é descrito por apresentar em sua constituição fitoquímica a presença de flavonóides (LOBO *et al.*, 2012; VICHNEWSKI *et al.*, 1999; BOHLMANN *et al.*, 1980) e, estes já são relatados por serem altamente tóxicos, tendo sua dose terapêutica próxima da tóxica (PICMAN 1986; SCHMIDT, 1999). Compostos pertencentes a esta classe, como a quercetina e a rutina foram identificadas na fração hidroalcoólica da *E. erythropappus*, sugerindo que podem estar envolvidas na citotoxicidade observada. Por exemplo, MITTRA *et al.*, (2000) ao avaliarem a quercetina, observaram toxicidade frente células normais humanas, levando a apoptose em células T. Em

outro estudo, BRUNALE *et al.*, (2007) observou efeito citotóxico da quercetina frente linhagens de fibroblastos de pulmão de hamster (V79), apresentando IC₅₀ de 450µM, para a rotina, o autor também observou toxicidade, contudo um pouco mais baixa, em que, na concentração de 800 µM, as células apresentaram 70% de viabilidade.

Figura 37: Avaliação da citotoxicidade da fração hidroalcoólica das partes aéreas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish sobre as linhagens L929 (células de mamífero) e RAW 264.7 (macrófagos), respectivamente.



Os resultados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular \pm desvio padrão de três experimentos, realizados em triplicata e estes foram comparados com os resultados obtidos para o controle de crescimento (RPMI ou MEM+DMSO). (***) corresponde a diferença significativa com $p \leq 0,0001$, considerando intervalo de confiança de 95%.

Corroborando os resultados aqui apresentados, SOUSA e colaboradores (2008) testaram a citotoxicidade do óleo essencial das folhas jovens e adultas de *Eremanthus erythropappus* frente às larvas de *Artemia salina* e, observaram efeito citotóxico, com CL₅₀ de 9,60 µg/mL e 9,25µg/mL, respectivamente para as folhas jovens e adultas. SOUSA *et al.* (2008b), também avaliaram a toxicidade do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* em camundongos (*in vivo*), detectando uma significativa toxicidade, com uma DL₅₀ de 2,90 g/Kg. Espécies da mesma família botânica também apresentaram efeitos citotóxicos frente células de mamífero, por exemplo, UENO e colaboradores (2018) avaliaram a toxicidade de

compostos isolados da espécie *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae) frente células L929 e observaram que, o ácido ent-15 β -seneciolyloxy-kaur-16-en-19-oic, isolado da planta, apresentou elevada toxicidade para as células, com CC₅₀ de 189.7 μ M.

SILVA (2015) avaliou o perfil químico e citotóxico das folhas de *Zanthoxylum riedelianum* Engl. frente a células de rim de macaco (linhagem LLC MK2), observando efeito tóxico, com CC₅₀ de 116,3 μ g/mL. É importante ressaltar, que neste estudo, o composto majoritário identificado nesta espécie foi à molécula de Fitol, classe dos terpenoides, que também foi identificada na fração hexânica em nosso presente estudo (Tabela 1 – Anexo B), sugerindo que tal composto pode estar relacionado com os efeitos citotóxicos observados para estas espécies vegetais.

Da mesma forma, os compostos pertencentes à classe dos ácidos e ésteres de ácidos graxos, como ácido palmítico e o ácido linolênico (Tabela 1 – Anexo B) também podem estar participando do processo citotóxico sobre as células de mamífero. Foram identificadas também as substâncias ácido palmítico, palmitato de etila, fitol, ácido linolênico e linolenato de etila na fração hexânica; hidroquinona na fração diclorometânica e; quercetina e rutina na fração hidroalcoólica (Tabela 1 – Anexo B). RODRIGUES (2015) ao avaliar a composição química e atividade citotóxica do extrato metanólico de torta de *Jatropha curcas* L. (Euforbiaceae) sobre células do rim bovino (MDBK) observou toxicidade, com CC₅₀ de 832,35 μ g/mL. Neste estudo, substâncias também pertencentes à classe dos ácidos e ésteres de ácidos graxos (ácido palmítico e ácido linolênico) também foram identificadas e, podem estar envolvidas na toxicidade sobre as células de mamífero, uma vez que ambas as espécies de plantas apresentam em sua composição tais constituintes bioativos.

Não foram encontrados na literatura, estudos que avaliassem a toxicidade de espécies do gênero *Eremanthus* frente linhagens de macrófagos. Contudo, em espécies vegetais da mesma família botânica já são relatados diversos efeitos citotóxicos em diferentes linhagens celulares de macrófagos, sendo então comum para espécies desta família Asteraceae. Por exemplo, ABU-DARWISH e colaboradores (2016) avaliaram a atividade citotóxica do óleo essencial de *Artemisia judaica* L. frente à linhagem de macrófagos RAW 264.7 e foi observada uma redução significativa na viabilidade destas células em três das quatro concentrações avaliadas (0,32; 0,64 e 1,25 μ g/mL).

Em outro estudo, POLITI *et al.*, (2016) avaliaram entre outras, a atividade citotóxica de três extratos etanólicos da espécie *Tagetes patula* L. (Asteraceae) frente macrófagos murinos (linhagem J774). Os autores observaram que todos os extratos foram altamente

tóxicos para as células, eliminando quase 100% dos macrófagos, especialmente o extrato AP_{EtOH 70%} (com 96,24% de lise celular).

Em conjunto, os resultados indicam que tanto o extrato etanólico bruto quanto suas respectivas frações, obtidas a partir das folhas e flores (partes aéreas) da espécie *E. erythropappus* apresentaram promissoras atividades antitumoral, antiparasitária e antimicrobiana, sendo que algumas concentrações se apresentaram superiores aos fármacos padrões em relação a redução a viabilidade celular. Contudo, tanto o extrato bruto como as frações mostraram elevada toxicidade frente às células normais de mamífero, uma vez que, mesmo se tratando de frações obtidas da partição, as mesmas ainda se tratam de uma mistura de constituintes químicos, sendo o isolamento de substâncias o ideal para tentar contornar tal toxicidade. Nesse contexto, é importante lembrar que espécies pertencentes ao gênero *Eremanthus* são comumente utilizadas na medicina popular, sendo as cascas do caule usadas na forma de chá, preparados em forma de decocto e, utilizadas como antimicrobiano, antiulceroso, cicatrizante e anti-inflamatório (MESSIAS 2015). Contudo, isso não significa que a espécie não possa ser utilizada pela população, uma vez que mais estudos devem ser realizados a fim de verificar a sua real toxicidade, utilizando diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, inclusive com o produto na forma mais semelhante ao uso popular. Porém, estes resultados servem de alerta para a população, para que os mesmos não as utilizem em doses elevadas, uma vez que podem ser citotóxicos como observado no presente estudo.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu ampliar o conhecimento científico da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish, tanto em relação a sua constituição química quanto em relação às suas atividades biológicas, contribuindo para a valorização de plantas do bioma Cerrado, proveniente do município de Diamantina/MG, inserido na região do Vale do Jequitinhonha. De uma forma geral, os dados obtidos permitiram:

- a) demonstrar nas partes aéreas da *Eremanthus erythropappus* a presença de oito metabólitos secundários (ácido palmítico, palmitato de etila, fitol, ácido linolênico, linolenato de etila, hidroquinona, quercetina e rutina) distribuídos em diferentes classes químicas (ácidos graxos e seus ésteres, terpenoides, compostos fenólicos e flavonóides). Sendo importante ressaltar, que alguns compostos como o fitol, ácido linolênico, linolenato de etila, hidroquinona e rutina foram demonstrados pela primeira vez nesta espécie.
- b) o extrato etanólico bruto e suas respectivas frações hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica apresentaram elevada citotoxicidade tanto sobre fibroblastos de camundongos (linhagem L929), quanto sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7. A espécie *E. erythropappus* é utilizada na medicina popular no tratamento de úlceras e infecções, como anti-inflamatória, antibacteriana, adstringente e agente cicatrizante. Considerando a toxicidade observada, torna-se importante o prosseguimento de estudos químicos e biológicos mais aprofundados, avaliando-a em modelos mais relacionados ao seu uso popular, eliminando assim potenciais riscos à saúde de quem as utilizam. Além disso, esses resultados sugerem que a aplicação terapêutica desta planta, provavelmente, se torna difícil devido à alta toxicidade observada, principalmente em relação à fração diclorometânica, que foi a fração mais tóxica dentre as avaliadas e, na qual foi identificada a hidroquinona, que já é descrita por apresentar efeito citotóxico em células de mamífero.
- c) na avaliação da atividade antitumoral, foi observado que o extrato e frações apresentaram atividade significativa frente ambas as linhagens. Considerando eficácia em relação ao paclitaxel, redução da viabilidade celular e IC₅₀, todos os extratos foram

promissores. Contudo, apenas a fração diclorometânica apresentou melhores valores de IS, que mesmo sendo inferiores a $IS > 2$ devem ser considerados, uma vez que a baixa seletividade celular e os efeitos citotóxicos são características dos fármacos antitumorais. Os demais extratos apresentaram valores de IS muito insatisfatórios, demonstrando falta de seletividade para células de tumor e limitando sua atividade terapêutica. Na fração diclorometânica foi identificada a substância hidroquinona, cujos análogos já haviam sido associados a essa atividade, não revelando, portanto, um novo potencial, mas somente corroborando estudos previamente realizados. Contudo, na análise do perfil químico desta fração, realizada pelo CG/EM, foi observado outros picos majoritários não identificados e, diante disso, outros componentes podem estar presentes nesta fração, necessitando de novas elucidações para identificação de supostos compostos.

d) em relação à atividade tripanocida, o extrato e frações foram muito efetivos contra este parasito em todas as maiores concentrações testadas, destacando-se a fração hidroalcoólica, que apresentou melhores valores de eficácia e redução da viabilidade deste parasito, superiores ao fármaco padrão, benzonidazol. Contudo, nenhum dos extratos se mostraram seletivos para o *T. cruzi*, sendo bastante citotóxicos ($IS < 2$) para as células de mamífero. Nesta fração foram identificados os compostos quercetina e rutina, dos quais já são descritos por apresentar atividade tripanocida, reforçando a idéia de que os mesmos podem estar atuando na atividade observada, mas não revelando novas alternativas já que outros estudos já demonstraram previamente esta atividade. Na análise do perfil químico da fração hidroalcoólica, a partir do HPLC-UV, também foram observados outros picos de alta intensidade no cromatograma e, estes podem ser referentes a outros metabólitos presentes nesta fração, contudo, diante da escassez de padrões de referência, não foi possível identificar novos compostos. Portanto, novas análises são necessárias, a fim de levar a identificação de novas moléculas a partir desta fração.

e) a avaliação da atividade leishmanicida do extrato bruto e frações demonstrou que todos os extratos também apresentaram significativa atividade contra as duas cepas. Sendo as frações diclorometânica e hidroalcoólica as que apresentaram melhores resultados, tanto em termos de eficácia (quando comparadas a anfotericina B), quanto na capacidade em reduzir a viabilidade parasitária. Contudo, da mesma forma

que foi observada para as outras atividades biológicas, aqui também foi observado baixo IS para todos os extratos e frações testados. A hidroquinona identificada na fração diclorometânica apresenta análogos já associados a essa atividade e; a quercetina e a rutina, identificadas na fração hidroalcoólica também já são demonstradas por apresentarem ação leishmanicida, não revelando, portanto, uma nova alternativa, mas somente corroborando estudos previamente realizados.

f) na avaliação da atividade antibacteriana, apenas o extrato etanólico bruto e as frações hexânica e diclorometânica apresentaram-se ativas frente alguma bactéria testada. Na fração hexânica e diclorometânica foram demonstrados a presença de compostos como o ácido linolênico, fitol, linolenato de etila, palmitato de etila, ácido palmítico e hidroquinona, e estes já são relatados por apresentarem ação antibacteriana, confirmando estudos já descritos para estas substâncias. Da mesma forma que foi relatado para a fração diclorometânica, na análise fitoquímica da fração hexânica, realizada no CG/EM também foram demonstrados diferentes picos no cromatograma, que podem representar diferentes substâncias, mas, que não foram identificados neste estudo e, novas análises são necessárias, a fim de levar a elucidação e identificação de novas moléculas a partir desta fração.

g) no ensaio de atividade antifúngica, tanto o extrato bruto quanto suas frações apresentaram-se ativas frente alguma cepa leveduriforme e, assim como outros estudos já demonstram, as substâncias identificadas nestas frações podem estar envolvidas na atividade observada frente as cepas fúngicas.

Diante do exposto, foi possível observar que muitos dos compostos identificados nas frações são relatados pela primeira vez nesta espécie vegetal, contudo, praticamente todos estes metabólitos secundários já são descritos por demonstrarem atividade frente os ensaios propostos, exceto o palmitato de etila, o ácido linolênico e o linolenato de etila, identificados na fração hexânica e, que já são descritos por apresentarem ação antimicrobiana e antitumoral, porém, carecem de estudos frente atividades tripanocidas e leishmanicidas, sendo necessário

dar prosseguimento aos estudos fitoquímicos desta fração, com o intuito de isolar tais substâncias e, realizar posterior análise biológica frente tais atividades, uma vez que, as substâncias isoladas poderão permanecer com as atividades observadas e, talvez serem menos citotóxicas para as células de mamífero. Além disso, as análises químicas não conseguiram identificar todos os compostos presentes nas amostras devido a sua complexidade, alguns presentes até de forma expressiva em frações que apresentaram boa atividade (fração hexânica e diclorometânica), assim novas análises são necessárias a fim de determinar melhor a associação dos constituintes das frações com as atividades observadas e seu potencial.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados observados demonstraram o potencial que as frações obtidas do extrato etanólico bruto de *E. erythropappus* apresentaram frente as atividades propostas, abrindo novas perspectivas para a realização de novos ensaios biológicos com possíveis compostos isolados que ainda carecem de estudos frente algumas atividades.

Além disso, todas as frações foram muito tóxicas para as células de mamífero, o que levou a valores de IS insatisfatórios, considerando as diferentes atividades avaliadas e, o isolamento de tais substâncias poderia contornar tal problema, visto que a substância responsável pela citotoxicidade dos extratos pode não ser a mesma responsável pela atividade biológica, o que melhoraria os IS.

Diante disso, é de grande interesse dar prosseguimento aos estudos frente à espécie *E. erythropappus*, uma vez que novos metabólitos secundários podem vir a ser identificados e isolados nestas frações. No presente trabalho, não foi possível identificar substâncias a partir das análises em RMN e, em outras técnicas como CLAE-EM-EM podem levar a identificação e posterior isolamento de compostos ainda não descritos para a espécie, além daqueles que já foram identificados e, que ainda carecem de atividades biológicas. Logo, alguns metabólitos secundários ainda necessitam de avaliação frente algumas atividades biológicas, como por exemplo, o palmitato de etila, o ácido linolênico e o linolenato de etila, que já são relatados por apresentarem ação antimicrobiana e antitumoral, contudo carecem de estudos frente atividades tripanocidas e leishmanicidas e, estes podem vir a serem candidatos promissores no desenvolvimento de novos fármacos.

8. REFERÊNCIAS

- ABELSON, H. T.; RABSTEIN, L.S. Lymphosarcoma: Virus-induced Thymic-independent Disease in Mice. **Cancer Research, Philadelphia**, v. 30, p. 2213-2222, 1970.
- ABU-DARWISH, M. S.; CABRAL, C.; GONÇALVES, M. J. *et al.* Chemical composition and biological activities of *Artemisia judaica* essential oil from southern desert of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology** 191, 161–168. 2016.
- ABUELIZZ, H. A.; EL-DIB, R. A.; MARZOUK, M. *et al.* In vitro Evaluation of new 2-phenoxy-benzo[g][1,2,4]triazolo[1,5-a]quinazoline derivatives as antimicrobial agents. **Microbial Pathogenesis**. 2018.
- ADAM, M.; ELHASSAN, G. O.; YAGI, S. *et al.* In Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activities of 18 Plants from the Erkowit Region, Eastern Sudan. **Natural products and bioprospecting**, 8(2), 97-105. 2018.
- ALBERNAZ L. C. **Atividades antiparasitárias e antifúngicas de plantas do Cerrado: *Spiranthera odoratissima* e *Diospyrus hispida***. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2010.
- ALDULAIMI, O. A. General Overview of Phenolics from Plant to Laboratory, Good Antibacterials or not. **Pharmacogn Rev.** 11(22): 123-127. 2017.
- ALEEBAHIM-DEHKORDY, E.; NASRI, H.; BARADARAN, A. *et al.* Medicinal plants, effective plant compounds (compositions) and their effects on stomach cancer. **International journal of preventive medicine**, 8. 2017.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(9), 4168-4170. 2001.
- ALMEIDA, I. C. **A INFECÇÃO FÚNGICA EM SAÚDE PÚBLICA**. 2015. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ. 2015.

ALMEIDA, L. M. S. D.; FARANI, P. G. S.; TOSTA, L. A. *et al.* In vitro evaluation of the schistosomicidal potential of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae) extracts. **Natural product research**, 26(22), 2137-2143. 2012.

ALMEIDA, M. D. F. O.; DE MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B. *et al.* Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (lecythidaceae). **Quim Nova**, 34(7), 1182-1187. 2011.

ALTOÉ, T. D. P. **Estudo Químico-Biológico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae)**. 2014. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Química. UFES. 2014.

ALTOÉ, T. F. **SUSTENTABILIDADE DE PLANTAÇÕES DE CANDEIA (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL**. 2012. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. UFLA. 2012.

AMARAL, J. G. **Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatos* Less (Asteraceae)**. 2008. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. USP. 2008.

AMBRÓSIO, S. R.; ARAKAWA, N. S.; ESPERANDIM, V. R. *et al.* Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 22(10), 1413-1415. 2008.

ANACHE, J. A.; FLANAGAN, D. C.; SRIVASTAVA, A. *et al.* Land use and climate change impacts on runoff and soil erosion at the hillslope scale in the Brazilian Cerrado. **Science of the Total Environment**, 622–623. 140–151. 2018.

ANDRADE, F. A. **ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES DE CANDIDA**. 2017. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia. Universidade Federal de Goiás. 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **MÓDULO, VII. Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em: 27 de Abril de 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa apresenta estratégias para segurança do paciente em hospitais e clínicas.** 2015. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-apresenta-estrategias-para-seguranca-do-paciente-em-hospitais-e-clinicas/219201/pop_up?inheritRedirect=false>. Acesso em 26 de Abril de 2018.

ARAÚJO, E. J. G. **MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA A REGENERAÇÃO NATURAL DE *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish (CANDEIA) EM ÁREAS SUBMETIDAS AO SISTEMA DE MANEJO COM PORTA SEMENTES.** 2015. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal do Paraná. 160p. 2015.

ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre MICRORGANISMOS relacionados à lesão de mucosite oral.** 2010. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2010.

ARAÚJO, S.; TEXEIRA SILVA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p.25-31, 2008.

ARIF, T., MANDAL, T.K., DABUR, R. Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, 81, pp, 283 – 311. 2011.

ASSIS, P. A. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DEPOSITADOS NO BANCO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO E DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *MATAYBA GUIANENSIS*.** 2013. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 2013.

AYRES, M. C., BRANDÃO, M. S., VIEIRA-JÚNIOR, G. M. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas uteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, 2008.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatrics**, 23(4): 320-328, 2001.

BALDIVIA, D.; LEITE, D.; CASTRO, D. *et al.* Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. **Int. J. Mol. Sci.**, 19(8). 2018.

BALLIANA, R.. C. S. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos bucais em *Candida albicans***. 2012. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas. UFES. 2012.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 51 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa. 2013.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E. *et al.* *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, 78(1), 155-168. 2011.

BAROCCI, S.; MANCINI, A.; CANOVARI, B. *et al.* *Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompromised patient. **New Microbiol**: 38(1):113–8, 2015.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, 32, 679-688, 2009.

BASTOS, M. L. A.; LIMA, M. R. F.; CONSERVA, L. M. *et al.* Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae). **Ann Clin Microbiol Antimicrob**. 8: 16. 2009.

BASTOS, G. M. **USO DE PREPARAÇÕES CASEIRAS DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**. 2007. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas. UFC. 2007.

BEER, M. F.; FRANK, F. M.; GERMÁN ELSO, O. *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satureiifolia* var. *satueiifolia*. **Pharmaceutical Biology**, Vol. 54, No. 10, 2188–2195. 2016.

BENTO, T. S.; TORRES, L. M. B.; MACHADO, L. P. *et al.* Hidroquinona e hidroquinona glicosilada (GC/EM) em *Casearia decandra* Jacq. e avaliação da atividade antifúngica. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. Disponível em "http://www.eventoexpress.com.br/cd-36rasbq/resumos/T0715-1.pdf. 2013".

BENZ, B. F., CEVALLOS, J., SANTANA, F. *et al.* Losing knowledge about plant use in the Sierra at the Manantlan Biosphere Reserve, Mexico. **Econ. Bot.** 54: 183-191, 2000.

BERO, J.; BEAUFAY, C.; HANNAERT, V.; *et al.* Antitrypanosomal compounds from the essential oil and extracts of *Keetia leucantha* leaves with inhibitor activity on *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Phytomedicine** 20, 270–274. 2013.

BEZERRA, L. D. A.; MANGABEIRA, P. A. O.; DE OLIVEIRA, R. A. *et al.* Leaf blade structure of *Verbesina macrophylla* (Cass.) F. S. Blake (Asteraceae): Ontogeny, duct secretion mechanism and essential oil composition. **Plant Biology**. 2018.

BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v.38, n.1, p. 920, 2012.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C. *et al.* Evaluation of the in vitro leishmanicidal activity of medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631-637, 2006.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C. *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538-1545, 2006.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M. *et al.* Sesquiterpene lactones from *Eremanthus* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2663-2668, 1980.

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R.Bailey. Global warming and other eco-myths. P. 29-60. **Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA**, 2002.

BOROWSKY, L.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. R. D. I. *et al.* Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do

Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p.1474-9, 2006.

BRACHET, A.; MUNHOZ, O.; GUPTA, M. *et al.* Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* stem-bark. **Phytochemistry**. v. 46, p. 1439-1442, 1997.

MARIA DAS GRAÇAS, L. B.; OLIVEIRA, V. B.; GOMES-BEZERRA, K. M. *et al.* Naturalistas europeus e as plantas medicinais do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG**, 21(2).2012.

BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C.; SILVA, J. C.; *et al.* Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 2067–2075. Vol. 58. 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Portaria n. 443, de 17 de dezembro de 2014**. Seção 1, p. 110-121. 2014. Disponível em: <<https://ckan.jbrj.gov.br/dataset/23f2e24c-5676-4acd-83f0-03621cba4364/resource/53e32c38-9d0e-486c-8b4e-666ddb30429/download/especiesportaria443.pdf>>. Acesso em 27 de Abril de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. HOSPITAL GERAL DE BONSUCESSO. COMISSÃO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. **Rede Hospitalar Federal no Rio de Janeiro**. 2010.

BRITO, R. N.; GORLA, D. E.; DIOTAIUTI, L. *et al.* Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: A multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance data. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 11 (11). 2017.

BRITO, S. M.; COUTINHO, H. D.; TALVANI, A. *et al.* Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chemistry** 186. 185–191. 2015.

BRITO, A. F.; RIBEIRO, M.; ABRANTES, A. M. *et al.* Ação anti-cancerígena da Quercetina no Carcinoma Hepatocelular: o papel do GLUT-1. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, (25): 23-30. 2013.

LEITE, F. B. V. M.; MELO, P. S. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE FLAVONOIDES EM CÉLULAS V79. **XV Congresso. Unicamp**. 2007. Disponível em: <<https://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xvcongresso/cdrom/pdfN/502.pdf>>. 2007.

BUYEL, J. F. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. **Biotechnology Advances**. 2018.

BYJU, K.; VASUNDHARA, G.; ANURADHA, V. *et al.* Presence of Phytol, a Precursor of Vitamin E in *Chaetomorpha Antinnina*. **Mapana J Sci**, 12, 2 (2013).

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CARIBÉ, R. A. **ABORDAGEM DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE LUFFA OPERCULATA COGN. (CUCURBITACEAE)**. 2008, 99 p. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

CARVALHO, A. A.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, É. B. V. *et al.* Antitumor Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, Article ID 392674, 21 pages, 2015.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: **Tecmedd Editora**, 2004.

ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMÍNGUEZ, F.; RUIZ-PADILLA, A. J. *et al.* Medicinal Plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for Humans: The Other Side of the Coin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 28p. 2017.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**. Volume 5, Número 3. 2013.

CECHINEL, F. V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim Nova** 21: 99-105. 1998.

CHEN, W.; HOU, J.; YIN, Y. *et al.* α -Bisabolol induces dose-and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas-and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NF κ B. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 247-254, 2010.

CHONG, Y.; SHIMODA, S.; YAKUSHIJI, H. *et al.* Fatal candidemia caused by azoleresistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 18, n. 5, p. 741-746, 2012.

DE MOURA CORDEIRO, T.; BORGHETTI, F.; OLIVEIRA, S. C. C. *et al.* Brazilian Cerrado *Qualea grandiflora* Mart. Leaves Exhibit Antiplasmodial and Trypanocidal Activities *In vitro*. **Pharmacogn Magazine**. 13(52): 668-672. 2017.

CORONADO-ACEVES, E. W.; GIGLIARELLI, G.; GARIBAY-ESCOBAR, A. *et al.* New Isoflavonoids from the extract of *Rhynchosia precatoria* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) DC. and their antimycobacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology** 206. 92–100. 2017.

CORREIA, A. F. **Avaliação da atividade antifúngica de extratis de plantas do Cerrado Brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida* spp.** 2016. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2016.

COSTA, G. C. **Caracterização do potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb.** 2010. 26p. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

CRACIUNESCU, O.; CONSTANTIN, D.; GASPARI, A. *et al.* Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. **Chemistry Central Journal**, 6:97. 2012.

CUNHA, L. F. **PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO: TRIAGEM FITOQUÍMICA E DE ATIVIDADE BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES NATIVAS DO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA, REGIÃO DO VALE DO JEQUITINHONHA, MINAS GERAIS.** 2016. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFVJM. 2016.

CUNHA, W. R.; SILVA, M. C. A.; TURATTI, I. C. C. *et al.* Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, p. 47-49, 2003.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 72, p. 132-141, 2002.

CRISTIE, W. W. Mass Spectrometry of Unesterified Fatty acids and their Trimethylsilyl Esters. **The Lipid Web**. Acesso em 26 de Outubro de 2018. Disponível em: <http://www.lipidhome.co.uk/ms/others/ffa-tms/index.htm>. 2018.

CRUZ, E. M.; SILVA, E. R.; CARMO, M. C. *et al.* Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p. 71-77, 2013.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. *et al.* Antimicrobial activity of some Hypericum species. **Phytomedicine**, v.10, p.511-6, 2003.

DANTAS, E. S.; GURGEL-GONÇALVES, R.; VILLELA, D. A. M. *et al.* Should I stay or should I go? Movement of adult *Triatoma sordida* within the peridomestic area of a typical Brazilian Cerrado rural household. **Parasites & Vectors**. 11:14. 2018.

DE LIMA, M.R.F.; XIMENES, E.C.P.A.; LUNA, J.S. *et al.* The antibiotic activity of some brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 16, nº 3, pag. 300-306, 2006.

OLIVEIRA, T. G. D.; PINA, P. S. S.; BERTONI, B. W. *et al.* Micropropagation of *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, vol. 41, nº. 10, pag. 1712-1718, out. 2011.

PAULA, C. D.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R. *et al.* Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/ dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 36, nº. 3, pag. 365-371, 2003.

DE SIQUEIRA, D. S.; DOS PEREIRA, A.; DE AQUINO NETO, F. R. *et al.* DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE MASSA MOLECULAR ALTA EM FOLHAS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 5, 633-640, 2003.

DE TOLEDO, J. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BORGES, C. H. *et al.* *In Vitro* Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* Promastigotes and Amastigotes. **Molecules**, 19. 2014.

DE TOLEDO, C. E.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaca as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 133, pag. 420-425, 2011.

DEL RÍO, J. A.; BÁIDEZ, A. G.; BOTÍA, J. M. *et al.* Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. **Food Chemistry**, n. 83, p. 75-78, 2003.

DEL-VECHIO, G.; SOUSA, O. V.; YAMAMOTO, C. H. *et al.* Atividades antinociceptiva e antimicrobiana de *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae). **Records of Natural Products**, vol. 88, n°. 4, pag. 181-184, 2008.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**. 52 (4): 455-63, 1999.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. *et al.* Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 1-7, 2011.

DIAS, J. C. P.; RAMOS JR, A. N.; GONTIJO, E. D. *et al.* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, 25: 7-86, 2016.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (eds.) **Medical Mycology**. Filadélfia, Churchill Livingstone, p. 195-239, 2003.

DINIZ, D. N.; MACÊDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. S. V. *et al.* Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p. 151-156, 2010.

DODDAPANENI, S. J. D.; AMGOTH, C.; KALLE, A. M. *et al.* Antimicrobial and anticancer activity of AgNPs coated with *Alphonsea sclerocarpa* extract. 3 **Biotech** 8:156. 2018.

- DU, Q.; XIN, G.; NIU, H. *et al.* Hydroquinone analog 4-[(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl) oxy] phenol induces C26 colon cancer cell apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo*. **MOLECULAR MEDICINE REPORTS**. 11: 4671 - 4677, 2015.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multi Ciência**, v. 7, p. 17, 2006.
- DUARTE, M. C. T., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. *et al.* Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.
- DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C. *et al.* Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, p.119-22, 2005.
- DUTRA, R. C.; FERRAZ, S. O.; PIMENTA, D. S. *et al.* Caracterização morfoanatômica das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeisch, Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(6): 818-824. 2010.
- DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O. *et al.* Investigation of analgesic and antiinflammatory activities of *Echinodorus grandiflorus* rizhomes methanol extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.4, 2006.
- ELSHARKAWY, E.; ALSHATHLY, M. Anticancer activity of *Lactuca steriolla* growing under dry desert condition of Northern Region in Saudi Arabia. **Journal of Natural Sciences Research**, vol. 3, n°. 2, 2013.
- ELSHIKH, M.; AHMED, S.; BANAT, I. M. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnol Lett**. 38: 1015–1019. 2016.
- EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, M.J.P.; BRANCO, M.D. *et al.* The application of Bayes' theorem in natural products as a guide for skeletons identification. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, vol. 40, pag. 83–92, 1998.
- ESHIET, E. R.; ZHU, J.; ANDERSON, T. A. *et al.* Chemical characterization of *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae) using gas chromatographic methods. **Food Sci Nutr** . 2(2): 105–113. 2014.

ESPANHA, L.G.; RESENDE, F.A.; LIMA NETO, J.S. *et al.* Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. **Complementary and Alternative Medicine**, vol. 5, pag. 14-182, 2014.

ESSID, R.; HAMMAMI, M.; GHARBI, D. *et al.* Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida strains*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 101:6993–7006. 2017.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal Ethnopharmacol**, volume 60, pag. 79-84, 1998.

FARIA, M. M. CANDEIAS (*EREMANTHUS SP.*): ESPECIALIZAÇÕES E INTERAÇÕES AMBIENTAIS NO MUNICÍPIO DE MARIANA (MG). 2012.

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas. UFV. 2012.

FATIMA, I.; KANWAL, S.; MAHMOOD, T. Evaluation of biological potential of selected species of family Poaceae from Bahawalpur, Pakistan. **Complementary and Alternative Medicine**. 18:27. 2018.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. B.; NEVA, F. A. Chronic Progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 272-280, 1964.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal Pharmacetical Science**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FERNANDES, G. W.; COELHO, M. S.; MACHADO, R. B. *et al.* Afforestation of savannas: an impending ecological disaster. **Natureza & Conservação** 14. 146-151. 2016.

FERNANDES, A. A.; RANGEL, C. D.; SENA, C. J. *et al.* Diversidade de Bactérias, Fungos e Formas de Resistência de Parasitos em Duas Rotas de Ônibus do Transporte Coletivo da Grande Vitória-ES. **Revista Sapientia** 11. 39–45. 2012.

- FERNANDÉZ-RUIZ, M.; PUIG-ASENSIO, M.; GUINEA, J. *et al.* *Candida tropicalis* bloodstream infection: Incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. **Journal of Infection**, v. 71, n. 3, p. 385-394, 2015.
- FERREIRA, T. M.; SILVA, F. D. S.; TEODORO, G. R. *et al.* Citral antifungal activity against *Candida* genus yeasts isolated from hospitalized patients. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 68(1):118-25, 2009.
- FERREIRA, S. H. (org.). MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL. Rio de Janeiro. **Academia Brasileira de Ciências**. 1998.
- FEYAERTS, A. F.; MATHÉ, L.; LUYTEN, W. *et al.* Essential oils and their components are a class of antifungals with potent vapour-phase-mediated anti-*Candida* activity. **Scientific Reports**. 8:3958. 2018.
- FIDOCK, D. A.; ROSENTHAL, P. J.; CROFT, S. L.. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 509-20, 2004.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.
- FILHO, V. C. **MEDICAMENTOS DE ORIGEM VEGETAL: ATUALIDADES, DESAFIOS E PERSPECTIVAS**. 1º ed. 192 p. UNIVALI. 2015.
- FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas – **Epidemiologia**. 2017. Disponível em <<http://chagas.fiocruz.br/epidemiologia/>>. Acesso em 26 de Abril de 2018.
- FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. 2013. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>>. Acesso em: 26 de Abril de 2018.
- DEL FIOL, F. D. S.; LOPES, L. C., TOLEDO, M. I. D. *et al.* Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 43(1):68-72, 2010.

FORMISANO, C.; SIRIGNANO, C.; RIGANO, D. *et al.* Antiproliferative activity against leukemia cells of sesquiterpene lactones from the Turkish endemic plant *Centaurea drabifolia* subsp. *Detonsa*. **Fitoterapia** 120. 98–102. 2017.

FORMISANO, C.; RIGANO, D.; SENATORE, F. *et al.* Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Anthemis mixta* and *A. tomentosa* (Asteraceae). **Natural Product Communications**. Vol. 7 (10) 2012.

FRANCESCATO, L. N.; DEUSCHLE, R. A. N.; MALLMANN, C. A. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 43, n. 2, 2007.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: **OCORRÊNCIA EM SUÍNOS ABATIDOS NA GRANDE RIO E SUA VIABILIDADE EXPERIMENTAL EM LINGUIÇA FRESCAL TIPO TOSCANA**. 2002, 144 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Fluminense. 2002.

FREIRE, J. C. P.; NÓBREGA, M. T. C.; DE OLIVEIRA-JÚNIOR, J. K. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, 5(6). 2016.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 15, n. 2, p. 178-82, 2005.

GARCÍA-PÉREZ, J. S.; CUÉLLAR-BERMÚDEZ, S. P.; ARÉVALO-GALLEGOS, A. *et al.* Identification of Bioactivity, Volatile and Fatty Acid Profile in Supercritical Fluid Extracts of Mexican arnica. **Int. J. Mol. Sci.**, 17, 1528. 2016.

GESZPRYCH, A.; PRZYBYŁ, J. L.; KUCZERENKO, A. *et al.* Diversity of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Growing Wild in Poland in Respect of the Content and Composition of Essential Oil and Phenolic Compounds. **Acta Hort.** 925. 2011.

GHADERI, A.; SONBOLI, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Tanacetum walteri* (Anthemideae-Asteraceae) from Iran. **Natural Product research**, 2018.

- GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance – Strengths, weaknesses and opportunities. **Plant Med.** 74(6): 594-602, 2008.
- GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.
- GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus* spp. Tópicos em Bacteriologia Veterinária. **FAVETUFRGS**. 2013.
- GOMÉZ, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E.; HERNÁNDEZ, A. Nosocomial candidemia: new challenges of an emergent problem. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 23, p.158-68, 2010.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 36, p. 71-80, 2003.
- GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T. *et al.* SEASONAL VARIATION OF THE MAJOR SECONDARY METABOLITES PRESENT IN THE EXTRACT OF *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) LEAVES. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 11, 2139-2145, 2012.
- GUIMARÃES, A.; RODRIGUES, A. S. L.; MALAFAIA, G. Adapting a rapid assessment protocol to environmentally assess palm swamp (Veredas) springs in the Cerrado biome, Brazil. **Environ Monit Assess.** 189: 592. 2017.
- GUIMARÃES, H. A.; NASCIMENTO, M. V. M.; GALDINO, A. T. P. M. *et al.* Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lytraceae (pacari), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 20, n° 3, pag. 328-333, 2010.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010a.
- GUTIERREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**; 10(12): 1105–1110. 2017.

HAFIZ, I.; BHATTI, H. N.; HANIF, M. A. *et al.* In-vitro antibacterial and antioxidant potential of winged prickly ash, green tea and thyme. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, 32 (1): 101-106. 2018.

HEEMANN, A. C. W. **ESTUDO FITOQUÍMICO, BOTÂNICO E DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE *Pterocaulon interruptum* DC. (ASTERACEAE)**. 2002. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFPR. 2002.

HEINRICH, M. Ethnobotany and its role in drug development. **Phytotherapy Research** 14: 479-488, 2000.

HOLETZ, F. B; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

IGWARAN, A.; IWERIEBOR, B. C.; OKOH, S. O. *et al.* Chemical constituents, antibacterial and antioxidant properties of the essential oil flower of *Tagetes minuta* grown in Cala community Eastern Cape, South Africa. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 17: 351. 2017.

INCA. Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>. Acesso em 26 de Abril de 2018.

INCA. Quimioterapia. 2018b. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 26 de Abril de 2018.

INCA. Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 134 p., 2012.

ISAACS, C. E.; KASHYAP, S.; HEIRD, W. C. *et al.* Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula feeds. **Arch Dis Child** 65: 861-864. 1990.

ISAACS, C. E.; LITOV, R. E.; THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. **J Nutr Biochem** 6: 362-366. 1995.

ITOH, S.; TAKETOMI, A.; HARIMOTO, N. *et al.* Antineoplastic Effects of Gamma Linolenic Acid on Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, 47, 81–90, 2010.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P. *et al.* Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Nat. Prod. Rep.** 28, 809–823. 2011.

JACKSON, N.; CZAPLEWSKI, L.; PIDDOCK, L. J. V. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience?. **J Antimicrob Chemother.** 2018.

JARADAT, N.; AL-LAHHAM, S. Phytochemical profile, antimicrobial, antioxidant and antiobesity activities of *Scolymus angiospermus* Gaertn. Four fractions from Jericho/Palestine. **Journal of Complementary and Integrative Medicine.** 2018.

JESUS, S.; PEDRO, W.; BISPO, A. Bird diversity along a gradient of fragmented habitats of the Cerrado. **An Acad Bras Cienc.** 2017.

JIMÉNEZ-COELLO, M.; GUZMAN-MARÍN, E.; ORTEGA-PACHECO, A. *et al.* Assessment of the Anti-Protozoal Activity of Crude *Carica papaya* Seed Extract against *Trypanosoma cruzi*. **Molecules**, 18, 12621-12632, 2013.

JOHANN, S.; MENDES, B. G.; MISSAU, F. C. *et al.* Antifungal activity of five species of Polygala. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1065-1075, 2011.

JUNIOR, J. M. S. **Atividade antitumoral da dihidrocucurbitacina B, um composto isolado de Wilbrandia ebracteata Cogn: estudos in vitro e in vivo.** 2007. 114 p. Dissertação de Mestrado. (Pós-Graduação em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

KADOSAKI, L. L; SOUSA, S. F; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Rev. Bras. Farm.** 93(2): 128-135, 2012.

KARMAHAPATRA, S.; KIENTZ, C.; SHETTY, S. *et al.* Capsicodendrin from *Cinnamosma fragrans* Exhibits Antiproliferative and Cytotoxic Activity in Human Leukemia Cells: Modulation by Glutathione. **Journal of Natural Products**, 2018.

KEFI, S.; ESSID, R.; MKADMINI, K. *et al.* Phytochemical investigation and biological activities of *Echium arenarium* (Guss) extracts. *Microbial Pathogenesis* 118. 211–213, 2018.

KEMAYKIN, V. M.; TABINBAEV, N. B.; KHUDAIBERGENOVA, M. S. *et al.* An Estimate of Severe and Chronic Fungal Diseases in the Republic of Kazakhstan. *J. Fungi*, 4(1), 34. 2018.

KHAN, T.; AHMAD, R.; AZAD, I. *et al.* Computer-aided drug design and virtual screening of targeted combinatorial libraries of mixed-ligand transition metal complexes of 2-butanone thiosemicarbazone. *Computational Biology and Chemistry*. 75, 178–19. 2018.

KHWAIRAKPAM, A. D.; DAMAYENTI, Y. D.; DEKA, A. *et al.* *Acorus calamus*: a bio-reserve of medicinal values. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018.

KIM, M.; CHOI, G.; LEE, H. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 7, n.1, p. 114-121, 2003.

KIRK R, SATI MH. Observations on the use of sodium antimony gluconate (sodium stibogluconate) in the treatment of kala-azar. *Ann Trop Med Parasitol*;41:14-21. 1947.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 147-55, 2005.

KONCIC, M. Z. Getting More Than You Paid For: Unauthorized “Natural” Substances in Herbal Food Supplements on EU Market. *Planta Med. Thieme*. 2017.

KOTB, E. R.; SOLIMAN, H. A.; MORSY, E. M. *et al.* NEW PYRIDINE AND TRIAZOLOPYRIDINE DERIVATIVES: SYNTHESIS, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT EVALUATION. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, Vol. 74 No. 3 pp. 861 - 872, 2017.

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G. *et al.* *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, n. 8, p. 873-880, 2010.

LADIO, A. H.; LOZADA, M. Patterns of use and knowledge of wild edible plants in distinct ecological environments: a case study of a Mapuche community from Nothwestern Patagonia. **Biodiversity and Conservation** 13: 1153-1173, 2004.

LAGO, N. C. M. R. **BACTÉRIAS do GRUPO do *Bacillus cereus* em LEITE e ESTUDO ENTEROTOXIGÊNICO das CEPAS ISOLADAS**. 2002. 83 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP - Campus de Jaboticabal. 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; RYAN, L. Leishmaniasis in Brasil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 10, n°. 1, pag. 125-128, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; WARD, R.D. *et al.* Leishmaniasis in Brazil : XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 239-242, 1979.

LAW, D.; MOORE, C. B.; JOSEPH, L. A. *et al.* High incidence of antifungal drug resistance in *Candida tropicalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.7, n. 4, p. 241-245, 1996.

LAZZARINI, C.; HARANAHALLI, K.; RIEGER, R. *et al.* Acylhydrazones as antifungal agents targeting the synthesis of fungal sphingolipids. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2018.

LEE, Y. H.; KIM, B.; HWANG, S. R. *et al.* Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems. **Journal of food and drug analysis** 26. 277-291. 2018.

LEITE, E. A. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO CISPLATINA**. 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFMG. 2010.

LEMES, G. F.; SANTOS, M. G.; DIAS, A. S. *et al.* **63^a Reunião Anual da SBPC. 2011.** Acesso em 25 de Abril de 2018. Disponível em: "<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/4012.htm>".

LEVINSON, W. Microbiologia médica e imunologia. **13 ed. Mc Graw Hill Brasil, part V,** 2016.

LOBO, J. F. R.; VINTHER, J. M.; BORGES, R. M. High-resolution α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antidiabetic compounds in *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae). *Molecules*, 21(6), 782.

LOBO, J. F.; CASTRO, E. S.; GOUVEA, D. R. *et al.* Antiproliferative activity of *Eremanthus crotonoides* extracts and centratherin demonstrated in brain tumor cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22(6): 1295-1300, Nov./Dec. 2012.

LOEUILLE, B. *Eremanthus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5315>>. Acesso em 25 de Abril de 2018.

LOEUILLE, B. *Eremanthus* in lista de espécies da flora do Brasil. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB005312>. Acesso em 25 de Abril de 2018.

LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. *et al.* Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron poiyphyllum* mart (Leguminosae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, supl. 2, p. 24- 27, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. **Nova Odessa, Instituto Plantarum**, 2002.

LORENZONI, L. S. ESTUDO FITOQUÍMICO E ANTIBACTERIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer. Goiânia**, v.9, n.17; p. 2796, 2013.

LOPES, J. L. C. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Eremanthus mattogrossensis* and *Eremanthus eriopus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 6,307-311. 1995.

- MACHADO, M. C. F. P.; MELO, J. M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, 2009.
- MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA, JR. V. PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DE ESTUDOS MULTIDISCIPLINARES. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.
- MAMANI-MATSUDA, M.; RAMBERT, J.; MALVY, D. *et al.* Quercetin Induces Apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, p. 924–929 Vol. 48, No. 3. 2004.
- MANUBOLU, M.; GOODLA, L.; OBULUM, V. R. Activity-guided isolation and identification of anti-staphylococcal components from *Senecio tenuifolius* Burm. F. leaf extracts. **Asian Pac J Trop Biomed**; 3(3): 191-195. 2013.
- MARANGO, S. N.; KHAYEKA-WANDABWA, C.; MAKWALI, J. A. *et al.* Experimental therapeutic assays of *Tephrosia vogelii* against *Leishmania major* infection in murine model: in vitro and in vivo. **BMC Res Notes**. 10:698. 2017.
- MARQUI, S. R.; LEMOS, R. B.; SANTOS, L. A. *et al.* SAPONINAS ANTIFÚNGICAS DE *Swartzia langsdorffii*. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 4, 828-831, 2008.
- MARTINEZ, N. P. **INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA RUTINA ENZIMATICAMENTE MODIFICADA NO ADENOCARCINOMA DE CÓLON. ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO**. 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. USF. 2016.
- MARTINS, M. M. **Constituintes voláteis, fenóis totais, capacidade antioxidante e biológica de folhas, flores e raízes da *Vernonia brasiliensis* Less.** 2012. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade federal de Uberlândia. 2012.
- MELO, V. V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. Guia Antimicrobianos. **Guia (Coordenação de Farmácia)** – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG). 1. Ed. 57f. 2012.

MELO, F. R. M. **Epidemiologia e distribuição espacial da mortalidade relacionada à doença de Chagas no Brasil, 1999 a 2007.** 2011. 259f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva) – Departamento de Saúde Comunitária. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

MENEGATI, S. E. L. T.; DE LIMA, F. F.; TRAESEL, G. K. *et al.* Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. **Journal of Ethnopharmacology** 194, 1096–1102. 2016.

MENEGUETTI, D. U. D. O.; LIMA, R. A.; MACEDO, S. R. A. *et al.* PLANTAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA COM POTENCIAL LEISHMANICIDA *in vitro*. **Rev Patol Trop** Vol. 44 (4): 359-374. out.-dez. 2015.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T. *et al.* Flora Vascular do Bioma Cerrado. **Planaltina, DF. EMBRAPA-CPAC**, p. 289-556, 1998.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. *et al.* Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 2 p. 354-355, 2009.

MENEZES, E. A.; SÁ, K. M.; CUNHA, F. A. *et al.* Frequency and susceptibility percentile of bacteria isolated in patients assisted in the Intensive Care Unit of the General Hospital of Fortaleza. **J Bras Patol Med Lab.** 43(3):149-55, 2007.

MESSIAS, M.C.T.B.; MENEGATTO, M.F.; PRADO, A.C.C. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, vol.17, n°. 1, pag. 76-104, 2015.

MICHELIM, L. Abordagem Biotecnológica em *Proteus mirabilis*. 126 p. **Tese de Doutorado.** Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2008.

DE MIERI, M.; MONTELEONE, G.; ISMAJILI, I. *et al.* Antiprotozoal Activity-Based Profiling of a Dichloromethane Extract from *Anthemis nobilis* Flowers. **Journal of Natural Products.** 80, 459–470. 2017.

MITSCHER, L.; LEU, R.; BATHALA, M. *et al.* Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale and methodology. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R. *et al.* Luteolin, an Abundant Dietary Component is a Potent Anti-leishmanial Agent that Acts by Inducing Topoisomerase II-mediated Kinetoplast DNA Cleavage Leading to Apoptosis. **Molecular Medicine** 6(6): 527–541, 2000.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética: introdução e o método da máxima parcimônia. **Biologia molecular e evolução**. 2001.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em 25 de Abril de 2018.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Quarto relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica: Brasil/Brasília**, p. 248, 2011.

MOHADJERANI, M.; HOSSEINZADEH, R.; HOSSEINI, M. Chemical composition and antibacterial properties of essential oil and fatty acids of different parts of *Ligularia persica* Boiss. **AJP**, Vol. 6, No. 3, May-Jun 2016.

MOLINA-GARZA, Z. J.; BAZALDÚA-RODRÍGUEZ, A. F.; QUINTANILLA-LICEA, R. *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Tropica** 136, 14–18. 2014.

MONTEIRO, P. S.; LACERDA, M. M.; ARIAS, J. R.; Controle da Leishmaniose no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 27: 67-72, 1994.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T.; SANTOS, K. K. *et al.* Citotocixidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 21, n. 1, p. 50-56, 2013.

MORALES, G.; PAREDES, A.; SIERRA, P.; *et al.* Antimicrobial Activity of Three *Baccharis* Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile. **Molecules**. 13(4), 790-794. 2008.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; VARANDAS, R. *et al.* Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Natural Product research**, Vol. 31, No. 24, 2905-2908. 2017.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; MAGALHÃES, N. O. *et al.* In vitro trypanocidal activity of solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of brazilian Cerrado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 903-907, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MUJEEB, F.; KHAN, A. F.; PATHAK, N. Phytochemical Study of *Aegle marmelos*: Chromatographic Elucidation of Polyphenolics and Assessment of Antioxidant and Cytotoxic Potential. 2018.

MUNIZ-RAMIREZ, A.; PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; GARCIA-BAEZ, E. *et al.* Antimicrobial activities of diterpene labdane from seeds of *Byrsonima crassifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe Plantas Medicinales Aromatic**, v. 13, n. 1, p. 31-7, 2014.

NAGHETINI, C. C. **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CÚRCUMA**. 2006. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C. *et al.* Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NAIR, J. J.; STADEN, J. V. Antifungal constituents of the plant family Amaryllidaceae. **Phytotherapy Research**. 1–9. 2018.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n.3, p. 49-58, 2013.

NASCIMENTO, F. R. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATO DE *PLECTRANTHUS ORNATUS* EM DIFERENTES IDADES DA PLANTA**. 2014. 73 p. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. 2014.

NASCIMENTO, A. M.; BRANDAO, M. G.; OLIVEIRA, G. B. *et al.* Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or b-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 92:95–100. 2007.

NCCLS. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; **Norma Aprovada, Segunda Edição**. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4], v. 22, n. 15 Estados Unidos, 2002.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

NEVES, P. R. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab** • v. 47 • n. 4 • p. 409-420 • agosto 2011.

NGEZAHAYO, J.; RIBEIRO, S. O.; FONTAINE, V. *et al.* In vitro Study of Five Herbs Used Against Microbial Infections in Burundi. **Phytotherapy Research**. 31: 1571–1578, 2017.

NICHOL, D.; JEAUVONS, P.; FLETCHER, A. G. *et al.* Steering Evolution with Sequential Therapy to Prevent the Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance. **PLOS Computational Biology**. 2015.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 74, n° 4, pag. 418-425, 2001.

NORDOY, I.; HESSTVEDT, L.; TORP ANDERSEN, C. *et al.* An Estimate of the Burden of Fungal Disease in Norway. **Journal of Fungi**, 4(1), 29. 2018.

NOVA, N. S. V. Atividade inibitória Leishmanicida e Colinesterásica de Compostos Fenólicos de *Dimorphandra gardneriana* e *Platymiscium fliribunbum*, plantas nativas do bioma Caatinga. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1164-1168, 2012.

NUNES, B. C. **PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis laevifolia* (MALPIGHIACEAE)**. 2016. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química. UFU. 2016.

OBOLSKI, U.; STEIN, G. Y.; HADANY, L. Antibiotic Restriction Might Facilitate the Emergence of Multi-drug Resistance. **PLOS Computational Biology**. June 25, 2015.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267 (17): 5421-5426, 2000.

OCHWANG'I, D. O.; KIMWELE, C. N.; ODUMA, J. A. *et al.* Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 215. 233–240. 2018.

OGBOLE, O.; SEGUN, P.; ADENIJI, A. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. **Complementary and Alternative Medicine**, 17: 494. 2017.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, F.; TEIXEIRA, P.; ALENCAR, A. *et al.* First parasitological, histopathological and molecular characterization of *Echinococcus vogeli* Rausch and Bernstein, 1972 from *Cuniculus paca* Linnaeus, 1766 in the Cerrado biome (Mato Grosso do Sul, Brazil). **Veterinary Parasitology** 250. 35–39. 2018.

OLIVEIRA, F. **Triagem da atividade Antitumoral e Antimicrobiana de plantas nativas do Cerrado da região de Diamantina - Vale do Jequitinhonha / Minas Gerais**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 2016.

OLIVEIRA, V. M.; CARRARO, E.; AULER, M. E. *et al.* Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 1029-1034, 2016b.

OLIVEIRA, F. F. S. **PESQUISA DE DADOS BOTÂNICOS DE PLANTAS ÚTEIS COLETADAS POR NATURALISTAS EUROPEUS NO SÉCULO XIX NO NORTE/NORDESTE DE MINAS GERAIS - Dados botânicos, químicos e ensaios antioxidantes de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil (Erythroxylaceae).** 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFVJM), 2014.

OLIVEIRA, R. P. **Purificação parcial e análise por CG/EM dos constituintes químicos presentes no extrato hexânico de *Struthanthus flexicaulis*.** 2012. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Química. UFJF. 108 p. 2012.

OLIVEIRA, P.C. **Ação dos extratos de *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss contra rotavírus.** 2011, 58 p. Monografia - Programa de pósgraduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Estado de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

OLIVEIRA, A. L.. L. **“Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (rhodomelaceae)”.** 2009. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, USP. 2009.

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista eletrônica de enfermagem**, v. 10, n. 1, 2008.

OLIVEIRA, M. S. **Inibição do crescimento fúngico e sua produção de micotoxinas por compostos fenólicos presentes em vegetais e seus resíduos.** 2005. Dissertação de Mestrado. Engenharia e Ciência de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

OLIVEIRA, A. G.; FALCÃO, A. L.; BRAZIL, R. P. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) na área urbana de Campo Grande, MS, Brasil. **Rev Saúde Pública**, 34(6):654-5. 2000.

OMS – Organização Mundial da Saúde. 2018a. Disponível em <http://www.who.int/chagas/home_transmission/en/>. Acesso em 28 de Agosto de 2018.

OMS – Organização Mundial da Saúde. 2018b. Disponível em <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em 26 de Abril de 2018.

OMS – Organização Mundial da Saúde. 2018c. Disponível em <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em 29 de Agosto de 2018.

OMS – Organización Mundial de la Saúde. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. 67 p. 2002. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67314/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf;jsessionid=80077E3FCEDD749BDAAEB17AE52882DF?sequence=1>. Acesso 24 de Agosto de 2018.

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S. *et al.* Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496-504, 2010.

PAGOTTO, T. C. P., SOUZA, P. R. Biodiversidade do Complexo Aporé-Sucuriú – Subsídios à conservação e manejo do bioma Cerrado. Campo Grande, **Ed.UFMS**, 2006.

PARDO, V. L. **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL GRAXO DO BIODIESEL DE TUNGUE E BLENDA COM SOJA EMPREGANDO GC-MS**. 2010. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química. FURG, Rio Grande do Sul, 2010.

PATEL, S. S.; RAGHUWANSHI, R.; MASOOD, M. *et al.* Medicinal plants with acetylcholinesterase inhibitory activity. **Rev. Neurosci. Aop**. 2018.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E. *et al.* Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 37-40, 2001.

PANIZZA, S. Plantas que curam (cheiro de mato). 15 ed. São Paulo: **IBRASA**, 279p. 1998.

PEREIRA, C.; MORENO, C. S.; CARVALHO, C. USOS FARMACOLÓGICOS DO *STRYPHNODENDRON ADSTRINGENS* (MAR.) – BARBATIMÃO. **Revista Panorâmica On-Line**. Vol 15, p. 127 – 137. 2013.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J. *et al.* An ent-Kaurane-Type Diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, vol. 17, pag. 8851-8858, 2012.

PEREIRA I. O.; SACRAMENTO L. V. S.; MARQUES M. J. Leishmanioses: «o estado da arte». **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 1, p. 220-38, 2011.

PÉRSIA, F. A.; RINALDINI, E.; CARRIÓN, A. *et al.* EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTITUMORAL PROPERTIES OF *TESSARIA ABSINTHIOIDES* (HOOK & ARN) DC, “PÁJARO BOBO”, AQUEOUS EXTRACT. **MEDICINA (Buenos Aires)** ; 77: 283-290. 2017.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 1986.

PINTO, A. P. R. **IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES EM EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS (ASTERACEAE) E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS**. 2016. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. UFOP. 2016.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C. *et al.* Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIOCHON, M.; LEGAULT, J.; GAUTHIER, C. *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural α -bisabolol β -D-fucopyranoside and analogues. **Phytochemistry**, v. 70, n. 2, p. 228-236, 2009.

POIRIER, M.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P. *et al.* Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 65, n. 19, p. 1437-1451, 2002.

POLITI, F. A.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M.; RODRIGUES, E. R. *et al.* Antifungal, antiradical and cytotoxic activities of extractives obtained from *Tagetes patula* L. (Asteraceae), a potential acaricide plant species. **Microbial Pathogenesis** 95, 15-20. 2016.

PRIMO, R. B. S. **CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO *Crambe abyssinica* NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTE**. 2013. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. UFGD. 2013.

PUPO, S. C.; DAVISON, G. P.; MARTINEZ-SÁNCHEZ, G. *et al.* Avaliação da atividade antiinflamatória crônica do extrato etanólico de *Bouchea fluminensis* (Verbenaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 27, p. 364-368, 2008.

QIN, Y.; LIU, W.; XING, R. *et al.* Cyclization Reaction of Acyl Thiourea Chitosan: Enhanced Antifungal Properties via Structural Optimization. **Molecules**, 23(3), 594. 2018.

QUINTERO, C. H. G. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. **Infectio**, v.14, p. 172-180, 2010.

RAFFAUF, R. R.; HUANG, R. K.; LE QUESNE, P. W.; *et al.* Eremantholide A, a novel tumor-inhibiting compound from *Eremanthus elaeagnus* (Compositae). **Journal of the American Chemical Society**, 97, 6884-6886. 1975.

RAJ, A. J.; BISWAKARMA, S.; PALA, N. A. *et al.* Indigenous uses of ethnomedicinal plants among forest-dependent communities of Northern Bengal, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 14:8. 2018.

RAMOS-CASTAÑEDA, J. A.; RUANO-RAVINA, A.; BARBOSA-LORENZO, R. *et al.* Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. **Journal of Infection**, 2018.

RASCHKE, W.C.; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell*, Cambridge, v. 15, p. 261-267, 1978.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**. v.15, p. 479-83, 2004.

REGASINI, L. O.; PIVATTO, M.; SCORZONI, L. *et al.* Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Rev. Bras. Farmacogn.** 20, 706–711. 2010.

REIS, L. T. C.; DA SILVA, M. R. D.; COSTA, S. L. *et al.* Estrogen and Thyroid Hormone Receptor Activation by Medicinal Plants from Bahia, Brazil. **Medicines** 5, 8; 2018.

REIS, A. S.; RIOS, C. E. P.; MELO, L. P. *et al.* Atividade leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**, 2012.

REISS, I; BORKHARDT, A.; FÜSSLE, R. *et al.* Desinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. **The Lancet**, v. 356, n. 9226, p. 310, 2000.

RESENDE, F. A.; NOGUEIRA, C. H.; ESPANHA, L. G. *et al.* In vitro toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.)Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 90. 2017.

RIBEIRO, I. C. D. O.; MARIANO, E. G. A.; CARELI, R. T. *et al.* Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**, 14:32. 2018.

RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In.: SANO, S. M; ALMEIDA, S. P; RIBEIRO, J. F. Ecologia e flora. Brasília: **EMBRAPA**, v. 1, p. 152-212, 2008.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. São Paulo: Editora Edgard **Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia**. ISBN: 85-212-0326-8. 2004.

RIOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharm.** 100(1-2):80-84, 2005.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L. *et al.* Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**. 2016.

RIVERO-CRUZ, J. F.; SANCHEZ-NIETO, S.; BENITEZ, G. *et al.* Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 37, p. 155-163, 2009.

RODRIGUES, R. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab** • v. 1 • n. 1 • p. 21-32. 2017.

RODRIGUES, D. A. **QUANTIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DOS ÉSTERES DE FORBOL EM TORTA E FARELO DE *Jatropha curcas* L.** 2015. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Agroquímica. UFV. 2015.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. **Lavras: UFLA**, 180 p. 2001.

RODRIGUES, D. G.; COVOLAN, C. C.; CORADI, S. T. *et al.* Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 54: 765–772. 2002.

ROLIM, T. L. Estudo fitoquímico de *Byrsonima gardneriana* A. Juss (Malpighiaceae). 126 f. **Dissertação de Mestrado** – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L. D.; SOEIRO, M. D. N. C. *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 105(2): 233-238, 2010.

ROSAL, L. F. Produção de Biomassa, óleo essencial e características fisiológicas e anatômicas foliares de *Plectranthus neochilus* Schlechter em função da adubação orgânica, malhas coloridas e idade das plantas. 134 p. **Tese de Doutorado**. Universidade federal de Lavras. 2008.

ROSAL, L. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. *et al.* Micropropagation of the Medicinal Plant *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **HORTSCIENCE** 42 (6): 1420–1424. 2007.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistêmico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 27, n. 6, p. 353-362, 2009.

RYHAGE, R.; STENHAGEN, E. Mass spectrometric studies II. Saturated normal long-chain esters of ethanol and higher alcohols. **Arkiv Kemi**, 14, 483-495 (1959).

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S; MUZZOLI, M. *et al.* Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, anti radicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SAINT-HILAIRE, A. F. C. P. Plantas Usuais dos Brasileiros. Traduzido por Maria das Graças Lins Brandão. Belo Horizonte: **IDM Composição e Arte Ltda**, 2009.

SALAS, M. P.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H. *et al.* Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1411-1415, 2011.

SALUSTIANO, M. E.; FERRAZ FILHO, A. C.; AMPÉLIO POZZA, E. *et al.* EXTRATOS DE CANDEIA (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) NA INIBIÇÃO IN VITRO DE *Cylindrocladium scoparium* E DE QUATRO ESPÉCIES DE FERRUGENS. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2, p. 189-193, abr./jun. 2006.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, volume 41, n. 5, p. 295-310, 1994.

SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S. *et al.* A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. **Internationale pharmaceutica sciencia**, v. 1, n. 1, p. 25-41, 2011.

SANTILIANO, F. C.; ALMEIDA, B. R. RESPOSTA IMUNE E MECANISMOS DE EVASÃO DESENVOLVIDOS PELO PROTOZOÁRIO PARASITA *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSADOR DA DOENÇA DE CHAGAS. **Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.8, N.14; p. – 2012.

SANTOS, K. A.; FROHLICH, P. C.; HOSCHEID, J. *et al.* Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents. **The Journal of Supercritical Fluids** 128. 323–330. 2017.

SANTOS, N. O. D.; MARIANE, B.; LAGO, J. H. G. *et al.* Assessing the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Brazilian Plants—*Eremanthus erythropappus* (Asteraceae), *Plectrantuns barbatus*, and *P. amboinicus* (Lamiaceae). **Molecules**, 20, 8440-8452. 2015a.

SANTOS, D. D. **CONTROLE DE QUALIDADE, ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Bidens pilosa* LINNAEUS (ASTERACEAE)**. 2015. Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia. UFSM. 2015b.

SANTOS, N. Q. A RESISTÊNCIA BACTERIANA NO CONTEXTO DA INFECÇÃO HOSPITALAR. **Texto Contexto Enferm**; 13 (n.esp): 64-70. 2004.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SARTORI, M. R. K. **ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS, FRATIONS AND PURE COMPOUNDS OF FLOWERS FROM *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. 2005. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacuticas. Universidade do Vale do Itajaí. 2005.

SCHIASI, M. C. E. V.; DE SOUZA, V. R.; LAGO, A. M. T. *et al.* Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry** 245, 305–311. 2018.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, v.3, p. 577-608, 1999.

SCHRODER, T.; GASKIN, S.; ROSS, K. *et al.* Antifungal activity of essential oils against fungi isolated from air. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, 2018.

SCHUCK, V. J.; FRATINI, M.; RAUBER, C. S. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Rev Bras Ciên Farm.** 37(1): 45-9. 2001.

SCHULZE, M. M. Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 4, n. 12, p. 17-23, 2007.

SCHWARTZ, S.; KONTOYIANNIS, D. P.; HARRISON, T. *et al.* Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. **Lancet Neurol.** 11p. 2018.

SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. *et al.* Manejo sustentado das candeias: *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish e *Eremanthus incanus* (Less.) Less. NEMAF-Núcleo de estudos em Manejo Florestal. 2016.

SEIBERT, G.; RAETHER, W.; DOGOVIĆ, N. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of avarone and avarol. **Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v. 260, n. 3, p. 379-386, 1985.

SENNA, L. R. **MARANTHOIDEAE E GOMPHRENOIDEAE (AMARANTHACEAE JUSS.) DO ESTADO DA BAHIA**. 2006. 176 p. Dissertação (Pós-graduação em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana. 2006.

SEKI, T.; KOKURYO, T.; YOKOYAMA, Y. *et al.* Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. *Cancer Science*, v. 102, n. 12, p. 2199-2205, 2011.

SERPA, R.; FRANÇA, E. J.; FURLANETO-MAIA, L. *et al.* In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. 12, p. 1704-1708, 2012.

SHIN, J.; PRABHAKARAN, VS.; KIM, K-S. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. **Microbial Pathogenesis**. 2018.

SHUKLA, S.; HEGDE, S.; KUMAR, A. *et al.* Fatty acid composition and antibacterial potential of *Cassia tora* (leaves and stem) collected from different geographic areas of India. **Journal of food and drug analysis** 26. 107 e 111. 2018.

SILVA, R. F. Fungal infections in immunocompromised patients. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

SILVA, F. M. *Listeria monocytogenes*: **UM PERIGO INVISÍVEL NOS ALIMENTOS**. 2009. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Medicina Veterinária. FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS. São Paulo. 2009.

SILVA, C. D. B. D.; GUTERRES, S. S.; WEISHEIMER, V. *et al.* Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**; 12(1): 63-6. 2008.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S. *et al.* Antimicrobial activity of *Syagrus oleracea* and *Mauritia vinifera* fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(2), 143-148. 2005.

SILVÉRIO, M. S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; PINTO, M. A. *et al.* Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish (Asteraceae). *Molecules*, 18. 2013.

SILVÉRIO, M. S.; SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G. *et al.* Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(3): 430-435, Jul./Set. 2008.

SILVÉRIO, M. S. **Estudo químico e farmacológico de *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz Bip. (Asteraceae)**. 2005. 94 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, S.; SOBEL, J. B.; BHARGAVA, P. *et al.* Vaginitis due to *Candida krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1066-1070, 2002.

SIMÕES, J. B. **ESTUDO DE PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS E TÉRMICAS DE BIODIESEIS E SUA CORRELAÇÃO COM PROPRIEDADES IMPORTANTES DE COMBUSTÍVEIS**. 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais. UENF. CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ. 2010.

SIMÕES, J. B. **CARACTERIZAÇÃO DA ASSINATURA ESPECTRAL DE BIODIESEIS E SUA CORRELAÇÃO COM PROPRIEDADES RELEVANTES DE COMBUSTÍVEIS**. 2007. Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da UENF. CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ. 2007.

SIMONETTI, E. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.18, n.1, p.9-18, 2016.

SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M. *et al.* Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, v. 83, n. 6, p. 737- 740, 2002.

SKAF, J.; HAMARSHEH, O.; BERNINGER, M. *et al.* Improving anti-trypanosomal activity of alkamides isolated from *Achillea fragrantissima*. **Fitoterapia** 125, 191–198. 2018.

SOARES, P. R. O; OLIVEIRA, P. L.; OLIVEIRA, C. M. *et al.* *In vitro* antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 3, p. 565-571, 2012.

SOARES, C. M.; VALADARES, G. F.; AZEREDO, R. M. C. D. *et al.* Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.504-510, mar-abr, 2008.

SOARES, T.V.; FABRI, R. L. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS FOLHAS DE *Eremanthus erythropappus* (DC) MCLEISH (CANDEIA). **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol. VIII (3), 41 - 52, 2011.

SOH, P. N.; BENOIT-VICAL, F. Are West African plants a source of future antimalarial drugs?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 130-140, 2007.

SON, J. Y.; YOON, S.; TAE, I. H. *et al.* Novel therapeutic roles of MC-4 in combination with everolimus against advanced renal cell carcinoma by dual targeting of Akt/pyruvate kinase muscle isozyme M2 and mechanistic target of rapamycin complex 1 pathways. **Cancer Medicine**. 7:5083–5095. 2018.

SOUSA, O. V.; SILVÉRIO, M. S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 60: 771–777. 2008.

SOUSA, O. V.; DUTRA, R. C.; YAMAMOTO, C. H. *et al.* Estudo comparativo da Composição Química e da Atividade biológica dos Óleos Essenciais das Folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 2, p. 113-116, 2008b.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SEVERI, J. A.; RODRIGUES, E. R. *et al.* Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural product research**, p. 1-4, 2018.

SOUZA, V. C. **MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE *Malassezia furfur*, *Malassezia obtusa* e *Malassezia sympodialis***. 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. UFAM. 2010.

SOUZA, E. L. **POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.): UMA ABORDAGEM PARA USO EM SISTEMAS DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**. 2006. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. UFPE. 2006.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In *Methods in Plant Biochemistry*. K. Hostettmann (Editor). **London Academic Press**; 1991.

SOARES, C. L. S.; PÉREZ, C. D.; MAIA, M. B. S. *et al.* Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 463-468, 2006.

SOETARDJO, S.; JONG, P. C.; NOOR, A. M. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of the *Centipeda mínima* (Asteraceae). **Mal J Nutr** 13(1): 81-87, 2007.

SOLON, S.; LOPES, L.; DE SOUSA, T. *et al.* Free radical scavenging activity of *Lafoensia jacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 72, n° 1-2, pag. 173-178, 2000.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G. *et al.* Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.379-384, 2004.

SULSEN, V.; GUIDA, C.; COUSSIO, J. *et al.* In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitology Research**, v. 98, n. 4, p. 370-374, 2006.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A. *et al.* Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 103, pag. 99–102, 2006.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R. *et al.* Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship,

and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TAVAKOLI, S.; VATANDOOST, H.; ZEIDABADINEZHAD, R. *et al.* Gas Chromatography, GC/Mass Analysis and Bioactivity of Essential Oil from Aerial Parts of *Ferulago trifida*: Antimicrobial, Antioxidant, AChE Inhibitory, General Toxicity, MTT Assay and Larvicidal Activities. **J Arthropod-Borne Dis**, 11(3): 414–426. 2017.

TAVARES, C. C. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS, GALHOS E FRUTOS DE *Eschweilera ovalifolia* (DC) Nied. (Lecythidaceae)**. 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amazonas. 2014.

TELLES, M.A.S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2):16-19, 2000.

THURNHOFER, S.; VETTER, W. A Gas Chromatography/Electron Ionization–Mass Spectrometry–Selected Ion Monitoring Method for Determining the Fatty Acid Pattern in Food after Formation of Fatty Acid Methyl Esters. **J. Agric. Food Chem.** 53, 8896–8903. 2005.

TOR-ANYIIN, T. A.; SHA‘ATO, R.; OLUMA, H. O. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Cissampelos mucronata* a. Rich (Menispermaceae) extracts. **Journal of Pharmacy & Bioresources**, v. 3, n. 2, p. 103-106, 2007.

TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; LOIZZO, M. R. *et al.* Studies on the potential antioxidant properties of *Senecio stebianus* Lacaita (Asteraceae) and its inhibitory activity against carbohydrate-hydrolysing enzymes. **Natural Product Research**. Vol. 26, No. 5, 393–404. 2012.

UENO, A. K.; BARCELLOS, A. F.; COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). *Fitoterapia*. 125, 55-58. 2018.

UNO, M.; KOKURYO, T.; YOKOYAMA, Y. *et al.* α -Bisabolol Inhibits Invasiveness and Motility in Pancreatic Cancer Through KISS1R Activation. **Anticancer Research**, v. 36, n. 2, p. 583-589, 2016.

VALDERRAMA, J. A.; ZAMORANO, C.; GONZÁLEZ, M. F. *et al.* Studies on quinones. Part 39: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4153-4159, 2005.

VANDEPUTTE, P; LARCHER, G.; BERGES, T. *et al.* Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 11, p. 4608-4615, 2005.

VARELA, J.; SERNA, E.; TORRES, S. *et al.* *In Vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Hydro-Ethanolic Extract and Isolated Active Principles from *Aristeguietia glutinosa* and Mechanism of Action Studies. **Molecules**, 19(6), 8488-8502. 2014.

VEIGA, A. **PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS**. 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFPR. 2016.

VICHNEWSKI, W.; SKROCHY, C. A.; NASI, A. M. *et al.* 15-Hydroxyeremantholide B and derivatives from *Eremanthus arboreus*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 317-320, 1999.

VICHNEWSKI, W; DIAS, D. A; TAKAHASHI, A. M. *et al.* Flavonoides isolados de *eremanthus eleagnus* sch. Bip. **Anais. Sao Carlos: Sbq**, 1990.

VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI A. M.; NASI A. M. T. T.; *et al.* Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelli*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. **Phytochemistry**, 28, 1441-1451. 1989.

VICHNEWSKI, W.; GILBERT, B. SHISTOSOMICIDAL SESQUITERPENE LACTONE FROM *EREMANTHUS ELAEAGNUS*. **Phytochemistry**, Vol. 11, pp. 2563 to 2566. 1972.

VIEIRA, A. J. R. **Aplicação dos Processos Oxidativos Avançados em resíduos contendo Hidroquinona**. 2006. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, USP, 2006.

VIDIGAL, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não?. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 45., n. 1., p. 55-64. 2009.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R.; CARNEIRO, D.M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 64-66, 2003.

VILLAMIZAR, L. H.; CARDOSO, M. D. G.; ANDRADE, J. D. *et al.* Linalool, a Piper aduncum essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 112(2): 131-139, 2017.

WANGCHUK, P.; YESHI, K.; JAMPHE, K. Pharmacological, ethnopharmacological, and botanical evaluation of subtropical medicinal plants of Lower Kheng region in Bhutan. **Integrative medicine research**. 6. 372–387. 2017.

XU, L.; LAO, Y.; ZHAO, Y. *et al.* Screening Active Compounds from *Garcinia* Species Native to China Reveals Novel Compounds Targeting the STAT/JAK Signaling Pathway. **BioMed Research International**. Volume 2015, Article ID 910453, 10 pages, 2015.


YAACOB, N. S.; HAMZAH, N.; KAMAL, N. N. N. M. *et al.* Anticancer activity of a subfraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 42, 2010.

YARED, J. A.; TKACZUK, K. H. Update on taxane development: new analogs and new formulations. **Drug Design, Development and Therapy**, 6:371-384. 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P. *et al.* Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, p. 819–825, 2001.

ANEXO A

Figura 1: Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AACD7CF

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	AACD7CF
Usuário:	UFVJM
CPF/CNPJ:	16.888.315/0001-57
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie
Miconia ferruginata DC
Agarista . oleifolia Judd.
Zeyheria montana Mart.
Ageratum fastigiatum Gardn.
Byrsonima dealbata Griseb.
Byrsonima lancifolia A. Juss.
Byrsonima verbascifolia (L.) DC
Croton antisyphiliticus Mart.
Gomphrena arborescens L.f.
Gomphrena virgata Mart.
Gomphrena vaga Mart.
Gomphrena scapigera Mart.
Kielmeyera lathrophyton Saddi.

ANEXO B

Tabela 1: Análise Fitoquímica das frações obtidas da partição do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Eremanthus erythopappus* (DC.) McLeish.

Análise Fitoquímica			
Fração	Compostos identificados	Classe	Método de identificação
Hexânica	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (ácido palmítico)	Ácido graxo	CG/EM
	Hexadecanoato de etila (palmitato de etila)	Éster de Ácido graxo	CG/EM
	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (Fitol)	Terpenóide (Diterpeno)	CG/EM
	Ácido linolênico	Ácido graxo	CG/EM
	Linolenato de etila	Éster de Ácido graxo	CG/EM
Diclorometânica	Hidroquinona	Compostos fenólicos (quinona reduzida)	CG/EM
Hidroalcoólica	Quercetina	Flavonóide	CLAE-UV
	Rutina	Flavonóide	CLAE-UV

Figura 1: Espectro de RMN ^1H da sub-fração (F10) da fase diclorometânica de *Eremanthus erythropappus* McLeish.

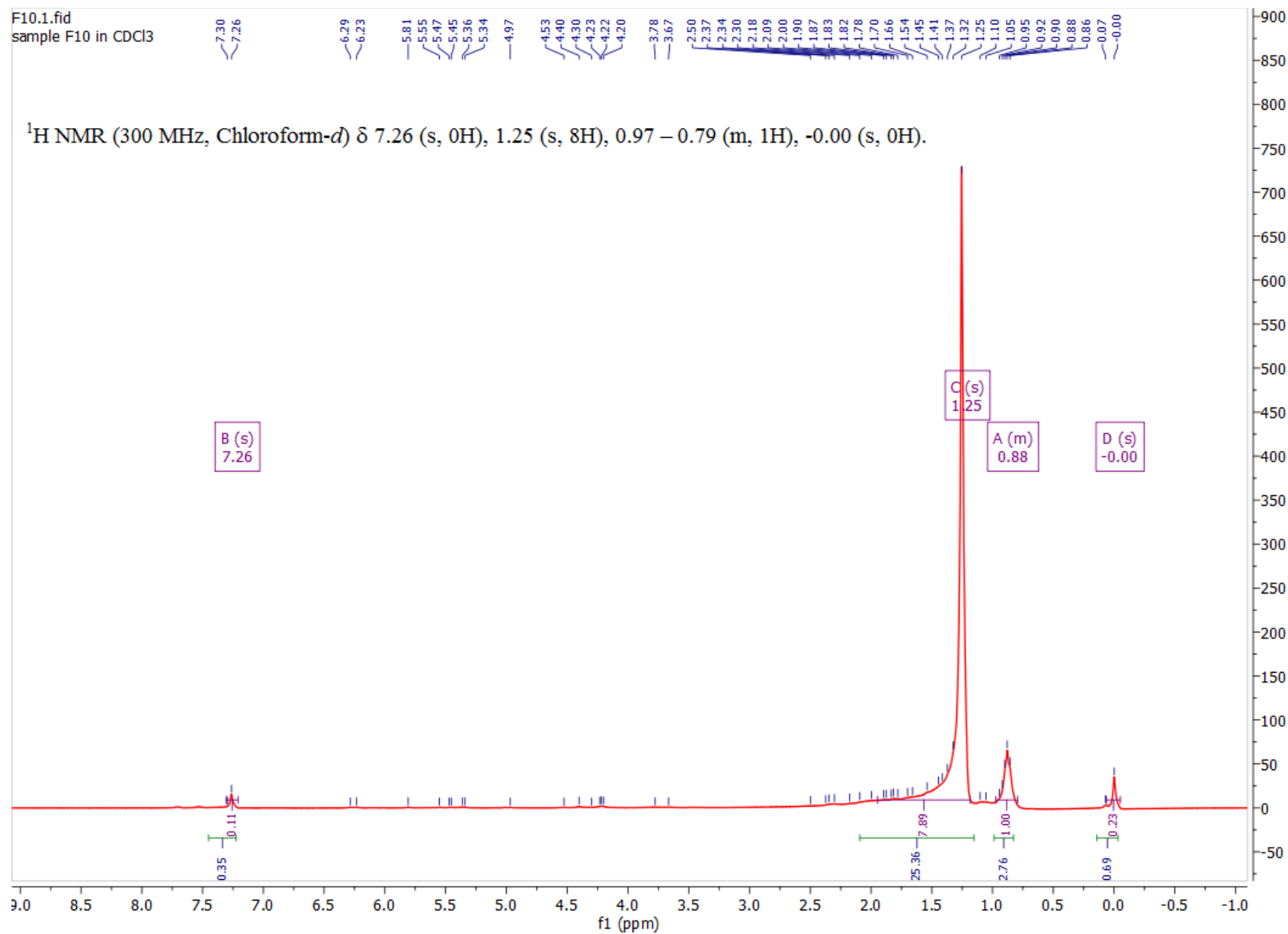


Figura 2: Espectro de RMN ^{13}C da sub-fração (F10) da fase diclorometânica de *Eremanthus erythropappus* McLeish.

